

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 959**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016** **E 18174251 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2023** **EP 3388075**

54 Título: **Nuevos péptidos y nuevas combinaciones de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra diversos tumores (SEQ ID N.º 25 - MXRA5-003)**

30 Prioridad:

27.03.2015 US 201562139189 P

27.03.2015 GB 201505305

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

07.11.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MAHR, ANDREA;
STEVERMANN, LEA;
WEINSCHENK, TONI;
SCHOOR, OLIVER;
FRITSCH, JENS y
SINGH, HARPREET

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 952 959 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 nuevas combinaciones de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra diversos tumores (SEQ ID N.º 25 - MXRA5-003)

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

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

Antecedentes de la invención

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 el cáncer fue una de las cuatro principales enfermedades no contagiosas mortales en el mundo. Ese mismo año, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el cáncer del aparato respiratorio se situaron entre las 10 primeras causas de muerte en los países de renta alta (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

Epidemiología

En 2012, se calcula que en todo el mundo hubo 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 32,6 millones de pacientes aquejados de cáncer (diagnosticado en los 5 años anteriores) y 8,2 millones de fallecimientos a causa de esta enfermedad (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

En los grupos de cáncer de cerebro, leucemia y cáncer de pulmón la descripción de interés compete específicamente al glioblastoma, la leucemia linfocítica crónica (CLL) y la leucemia mieloide aguda (AML) y al cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC) y microcítico (SCLC), respectivamente.

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

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

El cáncer de pulmón es el tipo más habitual de cáncer en el mundo y es la principal causa de muerte por cáncer en muchos países. Se divide en microcítico y amicrocítico. El cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC) incluye los tipos histológicos de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma macrocítico y supone el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón en Estados Unidos. La incidencia del NSCLC está estrechamente relacionada con la prevalencia del tabaquismo, que abarca tanto a fumadores activos como ex-fumadores, con un índice de supervivencia a cinco años descrito del 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

Tratamiento

Cáncer de mama

El tratamiento estándar para las pacientes con cáncer de mama depende de diversos parámetros: estadio del tumor, estado de los receptores hormonales y patrón de expresión de HER2. El tratamiento habitual consiste en la extirpación completa del tumor seguida de radioterapia. La quimioterapia a base de antraciclinas y taxanos puede comenzar antes o después de la extirpación. Las pacientes con tumores HER2-positivos reciben el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab además de los quimioterápicos (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2012). El cáncer de mama es una entidad tumoral inmunogénica en que la presencia de distintos tipos de células inmunitarias infiltrantes en el tumor primario se traduce

en una u otra pronóstiEn estos momentos están saliendo a la luz datos clínicos acerca de los efectos de la modulación de los puntos de control inmunitarios lograda por el ipilimumab y otros anticuerpos activadores de los linfocitos T en pacientes con cáncer de mama (Emens, 2012).

5 *Leucemia linfocítica crónica*

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es incurable hoy por hoy, pero muchos pacientes presentan una lenta progresión de la enfermedad o del empeoramiento de los síntomas. Aquellos pacientes cuya enfermedad es sintomática o progresa con rapidez disponen de varias opciones terapéuticas. Estas incluyen quimioterapia, tratamientos dirigidos, inmunoterapia como anticuerpos monoclonales, receptores antigénicos quiméricos (CAR) e inmunoterapia activa, y trasplante.

Varios ensayos finalizados y en curso están analizando linfocitos T autólogos que han sido modificados para incorporar un receptor antigénico quimérico (CAR) elaborado con técnicas de ADN recombinante y que demuestran especificidad hacia el CD19 (Maus et al., 2014). Hasta el momento solo una minoría de los pacientes participantes ha mostrado CAR detectables o persistentes. En ensayos con linfocitos T portadores de CAR efectuados por Porter y cols. y Kalos cols. se ha detectado una respuesta parcial (RP) y dos respuestas completas (RC) (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

La inmunoterapia activa incluye las estrategias siguientes: terapia génica, vacunas con células tumorales modificadas por entero, vacunas con células dendríticas y vacunas peptídicas con péptidos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA).

En la CLL aparecen sobreexpresados varios TAA que son adecuados para vacunas. Estos incluyen la fibromodulina (Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2 (Mayr et al., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), la proteína inmadura del receptor de la laminina/antígeno oncofetal (OFA/iLRP) (Siegel et al., 2003), adipofilina (Schmidt et al., 2004), survivina (Granziero et al., 2001), KW1 a KW14 (Krackhardt et al., 2002) y la región IgVHCDR3 derivada de tumor (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Se ha efectuado un ensayo clínico de fase I con el péptido R3 derivado del RHAMM como vacuna. Cinco de seis pacientes presentaron respuestas de linfocitos T CD8+ específicos del R3 (Giannopoulos et al., 2010).

Cáncer colorrectal

En el cáncer colorrectal (CRC), el estadio del tumor determina el tratamiento de elección. Las opciones habituales incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y tratamientos dirigidos (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b). sin ningún tratamiento de quimioterapia posterior. Los pacientes con tumores rectales de estadio T más elevado reciben quimiorradioterapia neoadyuvante con una fluoropirimidina antes de la excisión mesorrectal total (EMT) y quimioterapia adyuvante. Para el tratamiento quimioterápico se usan los fármacos capecitabina o 5-fluorouracilo (5-FU). Para la quimioterapia de combinación se recomienda el régimen de 5-FU con leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b).

CRC

Los ensayos clínicos más recientes analizan la inmunoterapia activa como opción terapéutica contra el CRC. Tales estrategias incluyen la vacunación con vacunas elaboradas con péptidos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA), células tumorales enteras, células dendríticas (CD) y vectores víricos (Koido et al., 2013).

Las vacunas peptídicas se han dirigido hasta el momento contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina 1, EGFR, el antígeno del carcinoma epidermoide reconocido por linfocitos T 3 (SART3), la gonadotropina coriónica beta humana (beta-hCG), el antígeno del tumor de Wilms 1 (WT1), survivina-2B, MAGE3, p53, proteína con dedo anular 43 y translocasa de la membrana mitocondrial externa 34 (TOMM34), o KRAS mutada. En varios ensayos clínicos de fase I y II los pacientes presentaron respuestas de LTC específicos de antígeno o la producción de anticuerpos. En contraste con las respuestas inmunitarias, muchos pacientes no obtuvieron beneficio clínico de las vacunas peptídicas (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Las vacunas con células dendríticas comprende CD estimuladas con péptidos derivados de TAA, o con lisados de células tumorales, células tumorales apoptóticas, ARN del tumor o bien con productos de fusión entre células tumorales y CD. Si bien muchos participantes en estudios de fase I/II mostraron respuesta inmunológicas específicas, solo una minoría obtuvo beneficio clínico (Koido et al., 2013).

Cáncer de esófago

La estrategia de tratamiento primaria del cáncer de esófago depende del estadio tumoral y de la localización, el tipo histológico y el estado de salud general del paciente. Los regímenes de quimioterapia como el oxaliplatino más fluorouracilo, el carboplatino más paclitaxel, el cisplatino más fluorouracilo, el FOLFOX y cisplatino más irinotecán. Los pacientes con tumores positivos para HER2 deben ser tratados según las directrices del cáncer gástrico, porque los

datos aleatorizados acerca de tratamientos dirigidos son muy escasos en el cáncer de esófago (Stahl et al., 2013).

No abundan los datos sobre estrategias inmunoterapéuticas en el cáncer de esófago, puesto que el número de ensayos clínicos en fases iniciales han sido muy pocos. Una vacuna consistente en tres péptidos derivados de tres antígenos de cáncer-testículo (proteína-cinasa TTK, locus K del complejo 6 del antígeno linfocítico, proteína 3 de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide (IG)-II) se administró a pacientes con cáncer de esófago avanzado en un ensayo de fase I con resultados moderados. La inyección intratumoral de los linfocitos T activados después de la exposición *in vitro* a células malignas autólogas desencadenó respuestas tumorales parciales o completas en cuatro de once pacientes de un estudio de fase I/II (Toomey et al., 2013).

Cáncer gástrico

El cáncer gástrico comienza en las células que recubren la mucosa y se extiende hasta las capas externas a medida que crece. Cuatro son los tipos de tratamiento estándar. El tratamiento del cáncer gástrico puede consistir en la extirpación quirúrgica endoscópica o convencional, quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia.

La eficacia de los regímenes terapéuticos actuales para el GC avanzado es escasa, con bajos índices de supervivencia a 5 años. La inmunoterapia podría ser una estrategia alternativa para mejorar la supervivencia de los pacientes con GC. La transferencia de linfocitos asociados al tumor y de células K estimuladas por citocinas, vacunas peptídicas que tengan como diana a HER2/neu, MAGE-3 o a los receptores 1 y 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular y las vacunas con células dendríticas que actúan contra HER2/neu han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos del cáncer gástrico. La inhibición del punto de control inmunitario y los linfocitos T manipulados genéticamente podrían suponer otras opciones terapéuticas adicionales, que están siendo evaluadas en estudios clínicos preclínicos y clínicos (Matsueda and Graham, 2014).

Glioblastoma

Las opciones disponibles para tratar el glioblastoma (grado IV de la OMS) son muy escasas. Se investigan distintas estrategias inmunoterapéuticas para el tratamiento del glioblastoma, incluida la inhibición de los puntos de control inmunitarios, la vacunación y la transferencia de linfocitos T modificados genéticamente.

Se están investigando distintas estrategias de vacunación para los pacientes con glioblastoma, como vacunas peptídicas, vacunas con proteínas de choque térmico, vacunas con células tumorales autólogas, vacunas con células dendríticas y vacunas con proteínas víricas. En estas estrategias los péptidos derivados de proteínas vinculadas con el glioblastoma como la variante III del receptor del factor de crecimiento epidémico (EGFRvIII) o las proteínas de choque térmico o las células dendríticas expuestas a lisado de células tumorales autólogas o componentes del citomegalovirus se aplican para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral en los pacientes con glioblastoma. Varios de tales estudios revelan perfiles de seguridad y tolerabilidad satisfactorios, así como datos de eficacia prometedores.

La transferencia de linfocitos T genéticamente modificados es un abordaje inmunoterapéutico adicional para el tratamiento del glioblastoma. Diferentes estudios clínicos evalúan en estos momentos la seguridad y la eficacia de linfocitos T portadores de un receptor de antígeno quimérico dirigido contra HER2, receptor alfa 2 de la IL-13 y el EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

Cáncer hepático

El tratamiento de la enfermedad depende del estadio tumoral en el momento del diagnóstico y del estado general del hígado.

La quimioterapia contra el carcinoma hepatocelular (HCC) incluye combinaciones de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino como tratamiento sistémico, y doxorrubicina, floxuridina y mitomicina C en infusiones en la arteria hepática. Pese a todo, la mayoría de los HCC muestran una elevada resistencia a los quimioterápicos (Enguita-German and Fortes, 2014).

Las opciones terapéuticas contra el HCC avanzada irresecable se limitan a Sorafenib, un inhibidor de la tirosina cinasa ligada a múltiples receptores (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Sorafenib es el único fármaco sistémico del que se ha confirmado que aumenta la supervivencia unos 3 meses y actualmente supone la única opción de tratamiento experimental para tales pacientes (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

Últimamente se ha efectuado un pequeño número de ensayos clínicos de inmunoterapia contra el HCC. En ellos se ha recurrido a citocinas para activar subtipos de células inmunitarias y/o potenciar la inmunogenicidad antitumoral (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Otros ensayos han optado por la infusión de linfocitos infiltrantes en el tumor o de linfocitos activados extraídos de la sangre periférica (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Hasta la fecha se ha ejecutado un contado número de ensayos de vacunación terapéutica. Butterfield y cols. llevaron a cabo dos ensayos con péptidos derivados de la alfa-fetoproteína (AFP) como vacuna o con células dendríticas cargadas *ex vivo* con péptidos de dicha proteína (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). En otros dos estudios diferentes se sensibilizaron células dendríticas (CD) autólogas *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.

Melanoma

10 El tratamiento de referencia contra el melanoma consiste en la resección quirúrgica completa con tejido circundante sano. Las opciones terapéuticas incluyen monoquimioterapia, poliquimioterapia y tratamientos dirigidos con inhibidores específicos (S3-Leitlinie Melanom, 2013).

15 Diversos enfoques de vacunación ya han sido evaluados en pacientes con melanoma avanzado. Hasta el momento, los ensayos de fase III han revelado resultados desalentadores y es claramente necesario mejorar estrategias de vacunación. En definitiva, nuevos estudios clínicos, como el ensayo con GM-CSF OncoVEX o el ensayo DERMA, persiguen mejorar la eficacia clínica sin mermar la tolerabilidad (<http://www.cancerresearchuk.org>).

20 Las transferencia de linfocitos T de donante ofrece grandes expectativas de cara al tratamiento del melanoma en estadios avanzados. La administración de linfocitos infiltrados en el tumor autólogos expandidos *in vitro* y de linfocitos T portadores de un receptor de linfocito T de alta afinidad para el antígeno cáncer-testículo NY-ESO-1 ha redundado en beneficios significativos y escasos efectos tóxicos tras la transferencia a pacientes con melanoma. Por desgracia, los linfocitos T con receptores de linfocito T de alta afinidad hacia los antígenos específicos de los melanocitos MART1 y gp100 y el antígeno de cáncer-testículo MAGEA3 han causado considerables efectos tóxicos en los ensayos clínicos. Así pues, la transferencia de linfocitos T de donante tiene un alto potencial terapéutico, aunque es preciso mejorar la seguridad y la tolerabilidad de tales tratamientos (Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013).

Cáncer de pulmón no microcítico

30 Las opciones de tratamiento vienen determinadas por el tipo (microcítico o no) y la fase del cáncer, e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas, como bevacizumab, erlotinib y gefitinib (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

35 Para ampliar las opciones terapéuticas del NSCLC, se han estudiado o se están investigando diferentes abordajes inmunoterapéuticos. Si bien la vacunación con L-BLP25 o MAGEA3 no ha podido demostrar una ventaja de supervivencia propiciada por la vacuna en pacientes con NSCLC, una vacuna derivada de una estirpe celular alogénica ha mostrado resultados prometedores en estudios clínicos. Además, hay en curso otros ensayos de vacunación dirigidos contra gangliósidos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico y otros diversos antígenos. Otra estrategia alternativa para potenciar la respuesta de linfocitos T antitumorales del paciente consiste en bloquear los receptores inhibidores de los linfocitos T o sus ligandos por medio de anticuerpo específicos. El potencial terapéutico de varios de esos anticuerpos, como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A y MEDI-4736, en el NSCLC se evalúa actualmente en ensayos clínicos (Reinmuth et al., 2015).

Cáncer de ovario

45 La resección quirúrgica es el tratamiento principal en el carcinoma ovárico tanto inicial como avanzado (S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013).

50 La inmunoterapia parece ser una estrategia prometedora para mejorar el tratamiento de las pacientes con cáncer de ovario, como la presencia de linfocitos infiltrantes en el tumor proinflamatorios, sobre todo los linfocitos T CD8-positivos, se correlaciona con un buen pronóstico y es posible aislar del tejido canceroso linfocitos T específicos para antígenos asociados a tumor.

55 Por consiguiente, se están invirtiendo mucho esfuerzo en la investigación de inmunoterapias contra el cáncer de ovario. Ya se ha llevado a cabo un considerable número de estudios preclínicos y clínicos y hay más estudios en curso en estos momentos. Hay disponibles datos clínicos de la terapia con citocinas, vacunación, anticuerpos monoclonales, trasplante de células e inmunomodulación.

60 Los estudios de vacunación de fase I y II, con uno o varios péptidos, derivados de varias proteínas asociadas a tumores (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, tumor de Wilms-1) o antígenos tumorales enteros, derivados de células tumorales autólogas han revelado un buen perfil de seguridad y tolerabilidad, pero con escaso o moderado efecto clínico.

65 La administración de células inmunitarias de donante se ha saldado con resultados variopintos en ensayos clínicos. La transferencia de linfocitos T infiltrantes del tumor autólogos cultivados *in vitro* ha demostrado ser un enfoque prometedor en un ensayo piloto. En cambio, la transferencia de linfocitos T portadores de un receptor antigénico quimérico específico del receptor del folato alfa no indujo una respuesta clínica significativa en un ensayo de fase I.

La estimulación de células dendríticas con lisado de células tumorales o con proteínas asociadas a tumor in vitro potenció la respuesta de linfocitos T antitumorales tras su transferencia, pero la magnitud de la activación de dichos linfocitos no se correlacionó con efectos clínicos. La transferencia de células NK causó toxicidades significativas en un estudio de fase II.

Tanto la inmunidad antitumoral intrínseca como la inmunoterapia se ven obstaculizadas por el microentorno inmunosupresor del tumor. Para vencer ese obstáculo se han probado fármacos inmunomoduladores como la ciclofosfamida, así como anticuerpos anti-CD25 y doxorubicina pegilada liposómica en combinación con la inmunoterapia. Los datos más fiables disponibles a día de hoy corresponden al ipilimumab, un anticuerpo anti-CTLA4, que potencia la actividad de los linfocitos T. El ipilimumab ha ejercido efectos antitumorales significativos en pacientes con cáncer de ovario (Mantia-Smaldone et al., 2012).

Cáncer de páncreas

Las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes con cáncer de páncreas son sumamente limitadas. Uno de los principales problemas para conseguir un tratamiento eficaz es lo avanzado que suele estar el tumor cuando se diagnostica.

Como otra alternativa innovadora y alentadora más, en estos momentos también se están investigando vacunas terapéuticas contra el cáncer de páncreas. Ya se han evaluado en ensayos clínicos vacunas peptídicas dirigidas contra mutaciones de KRAS, telomerasa reactiva, gastrina, survivina, CEA y MUC1, en parte con resultados prometedores. Asimismo, ensayos clínicos efectuados con vacunas de células dendríticas, vacunas secretoras de GM-CSF alogénicas y algenpantucel-L en pacientes con cáncer también han revelado efectos beneficiosos de la inmunoterapia. Además, hay en curso otros estudios clínicos que investigan la eficacia de diversos protocolos de vacunación (Salman et al., 2013).

Cáncer de próstata

La estrategia terapéutica contra el cáncer de próstata depende básicamente del estadio tumoral. En el cáncer de próstata local sin metástasis, las opciones terapéuticas incluyen la vigilancia activa (aguardar y ver), la extirpación completa de la próstata y la radioterapia local con dosis altas con o sin braquiterapia.

La vacuna de células dendríticas sipuleucel-T fue la primera vacuna antitumoral aprobada por la FDA. Debido a su efecto positivo sobre la supervivencia en los pacientes con CRPC, se ha hecho un gran esfuerzo por desarrollar nuevas inmunoterapias. En cuanto a las estrategias de vacunación, la vacuna peptídica TRICOM de antígeno específico de la próstata (PSA), la vacuna peptídica personalizada PPV, la vacuna de ADN pTVG-HP y la vacuna GVAX a base de células enteras que expresan el GM-CSF han mostrado resultados prometedores en diversos ensayos clínicos. Además, se ha demostrado que otras vacunas de células dendríticas aparte del sipuleucel-T, en concreto BPX-101 y DCVAC/Pa, desencadenan respuestas clínicas en pacientes con cáncer de próstata. Los inhibidores de los puntos de control inmunitarios como ipilimumab y nivolumab están siendo evaluados en estudios clínicos como monoterapia y en combinación con otros tratamientos, como el tratamiento de privación de andrógenos, la radioterapia local, PSA-TRICOM y GVAX. El inmunomodulador tasquinimod, que frenó significativamente la progresión y mejoró la supervivencia sin progresión en un estudio de fase II, sigue siendo investigado en un estudio de fase III. La lenalidomida, otro inmunomodulador, propició efectos prometedores en estudios clínicos de fase inicial, pero no mejoró la supervivencia en un estudio de fase III. A pesar de esos resultados negativos hay en marcha otros ensayos con la lenalidomida (Quinn et al., 2015).

Carcinoma de células renales

El tratamiento inicial consiste las más de las veces en la extirpación parcial o total del riñón o riñones afectados y sigue siendo el pilar del tratamiento curativo (Rini et al., 2008). Como tratamiento de primera línea para los pacientes con un mal pronóstico una guía elaborada por varias organizaciones y sociedades de oncología recomienda los inhibidores de la tirosina-cinasa de receptor (TKI) sunitinib y pazopanib, el anticuerpo monoclonal bevacizumab combinado con interferón- α (IFN- α) y el inhibidor de mTOR temsirolimús. Las directrices elaboradas por la NCCN de EE.UU. así como por las europeas EAU y ESMO, recomiendan los TKI sorafenib, pazopanib o recientemente el axitinib como tratamiento de segunda línea para los pacientes con CRC que han fracasado con las citocinas (IFN- α , IL-2). Las directrices de la NCCN aconsejan también el sunitinib en este marco (nivel de evidencia alto según la Categoría I de la NCCN).

La inmunogenicidad conocida del CRC ha representado la base que sustenta el uso de la inmunoterapia y las vacunas antitumorales en el CRC avanzado. La interesante correlación entre la expresión de PD-1 en los linfocitos y el estadio avanzado, el grado y el pronóstico del CRC, así como la expresión selectiva del PD-L1 por células tumorales del CRC y su posible asociación con peores desenlaces clínicos, ha conducido al desarrollo de nuevos agentes anti-PD-1/PD-L1, solos o en combinación con fármacos anti-angiogénicos u otros abordajes inmunoterapéuticos, para el tratamiento del CRC (Massari et al., 2015). En el CRC avanzado, un ensayo con una vacuna antitumoral de fase III llamado estudio TRIST evalúa si TroVax (vacuna con un antígeno asociado a tumor, 5T4, con un vector poxvírico), sumado al

tratamiento de referencia de primera línea, prolonga la supervivencia de pacientes con CRC localmente avanzado o metastásico. La mediana de la supervivencia no ha sido alcanzada en el grupo de 399 pacientes (54%) restantes del estudio a pesar de que el análisis de los datos confirma los resultados clínicos previos, lo que demuestra que TroVax es tanto inmunológicamente activa y que existe una correlación entre la magnitud de la respuesta de anticuerpos específicos de 5T4 y la mejora de la supervivencia. Hay otros estudios que buscan vacunas peptídicas con epítomos que se sobreexpresan en el CRC.

Se están investigando diversas estrategias con vacunas antitumorales. Se han efectuado estudios con abordajes basados en el tumor entero, como lisados de células tumorales, fusiones de células dendríticas con células tumorales, o ARN del tumor entero en pacientes con CRC, y se han descrito remisiones de las lesiones tumorales en algunos de tales ensayos (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

Cáncer de pulmón microcítico

El tratamiento y el pronóstico del cáncer de pulmón microcítico dependen en buena medida del estadio tumoral en que se diagnostica. En este tipo de cáncer, la estadificación basada en los resultados clínicos es más habitual que la estadificación histopatológica. La estadificación clínica se basa en los resultados de la exploración física, en diversas pruebas de diagnóstico por la imagen y en biopsias. La quimioterapia estándar para el cáncer de pulmón microcítico consiste en la combinación de etopósido o irinotecán con cisplatino o carboplatino (American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

La inmunoterapia constituye un campo profusamente investigado en el tratamiento contra el cáncer. Son varias las estrategias estudiadas como tratamiento contra el cáncer de pulmón microcítico. Una de ellas persigue el bloqueo del CTLA-4, un inmunodepresor humano natural. La inhibición del CTLA-4 pretende potenciar el sistema inmunitario para que combata el cáncer. En fecha reciente ha comenzado el desarrollo de prometedores inhibidores de los puntos de control inmunitarios para el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico. Otro abordaje consiste en el uso de vacunas antitumorales que actualmente están disponibles como tratamiento contra el cáncer de pulmón microcítico en el marco de estudios clínicos (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

Leucemia mieloide aguda

El tratamiento de la AML se divide en dos fases: tratamiento de inducción y tratamiento de consolidación o postremisión. El tratamiento de inducción se administra para provocar la remisión y consiste en quimioterapia combinada. El tratamiento de consolidación consiste en quimioterapia adicional o en el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) (Showel and Levis, 2014).

Los ensayos clínicos son recomendables para los pacientes que pertenecen a los grupos de pronóstico desfavorable e intermedio-2. Las opciones de tratamiento incluyen agentes hipometilantes (HMA) como la azacitidina o la decitabina, el CPX-351, que es una formulación liposómica de daunorrubicina y citarabina con un cociente molar «óptimo» de 1:5, y el volasertib, que es un inhibidor de las cinasas polo. El volasertib se administra combinado con LDAC (citarabina en dosis bajas). En caso de mutaciones de FLT3 se pueden administrar diversos inhibidores de la FLT3. Estos incluyen el sorafenib, que se administra en combinación con 3+7, el quizartinib, un inhibidor más selectivo de FLT3 ITD que también inhibe a CKIT, el crenolanib, y la midostaurina, un inhibidor no selectivo de FLT3 ITD. Otra opción terapéutica consiste en el tratamiento dirigido contra el CD33 con conjugados de anticuerpo y fármaco (anti-CD33 + caliqueamicina, SGN-CD33a, anti-CD33 + actinio-225), anticuerpos biespecíficos (reconocimiento de CD33 + CD3 (AMG 330) o de CD33 + CD16) y receptores de antígeno quiméricos (CAR) (Estey, 2014).

Linfoma no hodgkiniano

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

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

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

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

insecto o de mamífero.

Cáncer de útero

- 5 Más del 80% de los cánceres de endometrio se manifiestan como adenocarcinomas endometrioides (tipo I), una forma vinculada con la exposición a los estrógenos y que muestra un grado de diferenciación marcado o moderado. El tratamiento de los carcinomas endometriales y de los tumores del cuello uterino depende del estadio (World Cancer Report, 2014).
- 10 Hay también algunos abordajes inmunoterapéuticos que están siendo objeto de estudio en este momento. En un ensayo clínico de fase I/II a pacientes aquejadas de cáncer de útero se las ha vacunado con células dendríticas (CD) autólogas que han sido sometidas a electroporación para absorber ARNm del gen 1 del tumor de Wilms (WT1). Aparte de un caso de reacción alérgica local al adyuvante, no se observaron efectos secundarios adversos y 3 de 6 pacientes mostraron respuesta inmunitaria (Coosemans et al., 2013).

Adenocarcinoma de la vesícula biliar y colangiocarcinoma

- El colangiocarcinoma resulta difícil de tratar y normalmente es mortal. La única opción de tratamiento curativa es la resección completa (R0). La eficacia demostrada por las terapias biológicas en el cáncer biliar ha sido desigual. En este momento se están estudiando en el marco del colangiocarcinoma diversos agentes biológicos dirigidos contra el crecimiento de los vasos sanguíneos, como sorafenib, bevacizumab, pazopanib y regorafenib. Además, en el marco de ensayos clínicos se están combinando con la quimioterapia otros agentes biológicos dirigidos contra el EGFR, como el cetuximab y el panitumumab (American Cancer Society, 2015). Con todo, hasta el momento no se ha observado ninguna mejora significativa del control de la enfermedad y de la supervivencia global con la mayoría de los medicamentos estudiados, aunque prosiguen los ensayos clínicos en este sentido.

- El cáncer de vesícula biliar (GBC) es la neoplasia maligna más frecuente y agresiva de las vías biliares en todo el mundo. Debido a la rareza de los carcinomas de las vías biliares en general son muy pocos los estudios específicos del CCC y del GBC, y la mayoría incluyen tumores de las vías biliares de todos los tipos. Por esa razón el tratamiento no ha mejorado en las últimas décadas y la resección R0 sigue siendo la única opción de tratamiento curativa.

Cáncer de vejiga urinaria

- El tratamiento estándar contra el cáncer de vejiga urinaria incluye la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia (National Cancer Institute, 2015).

- Hay establecido un abordaje inmunoterapéutico eficaz para el tratamiento del cáncer vesical agresivo sin invasión muscular (NMIBC, por sus siglas en inglés). Consiste en la administración en solución intravesical de una forma atenuada de la bacteria *Mycobacterium bovis* (*bacilo de Calmette-Guérin*, BCG). El principal efecto del tratamiento con BCG es la notable protección a largo plazo (hasta 10 años) frente a la recidiva tumoral, así como la ralentización de la progresión. En principio, el tratamiento con el BCG desata una respuesta inflamatoria local que estimula la respuesta inmunitaria celular. La respuesta inmunitaria contra el BCG se basa en los siguientes puntos clave: infección de las células cancerosas vesicales y uroteliales por el BCG, seguida del aumento de la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno, inducción de la respuesta inmunitaria mediada a través de la liberación de citocinas, estimulación de la actividad antitumoral por la intervención de diversas células inmunitarias (linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, células NK y macrófagos) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

- A la vista de los graves efectos secundarios y del coste que comporta el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados para el tratamiento del cáncer en general, y, en particular, carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), cáncer de páncreas (CP), carcinoma de células renales (CRC), hiperplasia benigna de próstata (HBP), cáncer de próstata (CPr), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC y CCC), cáncer de vesícula urinaria (UBC) y cáncer de útero (UEC). Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y de los susodichos tipos de cáncer en particular, con vistas a mejorar el diagnóstico, la valoración del pronóstico y la predicción del éxito terapéutico.

- La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra las células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores. La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

- a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatocitos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no

expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

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

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

d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.) Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

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

f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

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

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

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

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

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) reviste gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic et al., 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara et al., 2006) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos (Hwang et al., 2007).

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

5 descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel y cols., 2006).

Los péptidos alargados de la descripción pueden actuar como epítomos activos para las MHC de clase II.

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

15 con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

20 En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

30 Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítomo peptídico) o por los linfocitos T colaboradores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítomo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

35 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 II suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados ("anclaje") en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un "motivo de unión" que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

40 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.

45 Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente

50 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

55 asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

65 Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluídas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles

de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales. No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la descripción es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras ("linfocito T efector").

En el caso de dirigir la acción contra complejos péptido-MHC a través de TCR específicos (p. ej., TCR solubles) y de los anticuerpos u otras moléculas de unión (soportes) conformes a la descripción, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En tales casos, la presentación es el factor determinante.

En la patente W02015/018805A1 se da a conocer un péptido derivado del gen MXRA5 que se une al HLA- A*02 pero no se da a conocer un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 25 que tiene una longitud total que va de 11 a 16 aminoácidos.

Bassani-Sternberg et al. (2015) dan a conocer un método de gran capacidad basado en la espectrometría de masas para la identificación de HLA que presentan péptidos asociados con el cáncer pero no dan a conocer un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 25 que tiene una longitud total que va de 11 a 16 aminoácidos.

En la patente WO02/086443A2 se da a conocer el gen MXRA5 asociado con el cáncer pero no se da a conocer un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 25 que tiene una longitud total que va de 11 a 16 aminoácidos.

Resumen de la invención

La presente invención concierne a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 25 tal y como se define en la primera de las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones adjuntas se definen otros aspectos de la invención.

En un primer aspecto se da a conocer un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 288 o a una secuencia variante de la misma que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288, 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.

Si bien el criterio más importante para que un péptido pueda servir como diana del tratamiento antitumoral es su sobrerepresentación en tejidos del tumor primario con respecto a los tejidos normales, el perfil de expresión del ARN del gen correspondiente también puede ayudar a escoger los péptidos adecuados. En concreto, algunos péptidos son difíciles de detectar por espectrometría de masas, ya sea por sus propiedades químicas o por su escaso número de copias en las células, y una estrategia de cribado centrada en la detección de la presentación del péptido puede no identificar esas dianas. Con todo, esas dianas pueden ser detectadas por una estrategia alternativa que comience con el análisis de la expresión génica en los tejidos normales y que después evalúe la presentación del péptido y la expresión génica en los tumores. Esa es la estrategia aplicada en la presente descripción con datos del ARNm disponibles en una base de datos de acceso público (Lonsdale, 2013) en combinación con otros datos de expresión génica (incluidas muestras tumorales), así como datos de presentación de péptidos. Si el ARNm de un gen está casi ausente en los tejidos normales, sobre todo en los órganos vitales, la actuación dirigida contra los péptidos correspondientes con estrategias muy potentes (como anticuerpos o receptores de linfocitos T cuya afinidad sea optimizada por biespecificidad), tiene más posibilidades de ser segura. Tales péptidos, aunque se identifiquen únicamente en un pequeño porcentaje de tejidos tumorales, representa dianas interesantes. El análisis ordinario con espectrometría de masas no es lo bastante sensible para valorar la cobertura de dianas a nivel del péptido. Y en su lugar para valorar esa cobertura se puede recurrir a la expresión de ARNm en el tumor. Para la detección del propio péptido, puede ser necesario un método de espectrometría de masas dirigido dotado de mayor sensibilidad que pueda conducir a una mejor estimación de la cobertura sobre el nivel de la presentación del péptido.

También se da a conocer un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 288 o una variante de las mismas, que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos en un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288, en que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

Las tablas siguientes muestran el péptido conforme con la presente descripción, su respectiva SEQ ID N.º, y el probable gen originario (subyacente) de este péptido. El péptido de la Tabla 1 se une a los alelos HLA-A*02.

Tabla 1: Péptido conforme a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) génicos oficiales
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5

5

Se prefieren especialmente los péptidos –solos o en combinación– conformes con la presente descripción seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 288 y sus usos en la inmunoterapia de los siguientes tipos de cáncer: carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), cáncer de páncreas (CPc), carcinoma de células renales (CRC), hiperplasia benigna de próstata (HBP), cáncer de próstata (CPr), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama (CM), leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC) y cáncer de útero (UEC).

10

15

Se prefiere más el péptido de SEQ ID N.º 25 (véase la Tabla 1) y sus usos en la inmunoterapia del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero y leucemia linfocítica crónica.

20

La presente descripción se refiere, además, a péptidos como el dado a conocer en la presente memoria 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.

25

La presente descripción se refiere, además, a péptidos como el dado a conocer en la presente memoria en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288.

30

La presente descripción se refiere, además, a los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria, en que dichos péptidos están modificados y/o incluyen enlaces no peptídicos.

35

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

40

La presente descripción se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria. La presente descripción se refiere, además, al ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

45

La presente descripción se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria.

50

La presente descripción se refiere, además, a un péptido como el dado a conocer en la presente memoria, un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria o un vector de expresión como el dado a conocer en la presente memoria para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer.

55

La presente descripción concierne, además, a anticuerpos específicamente dirigidos contra los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria o contra complejos formados por los péptidos dados a conocer en la presente memoria con el MHC, así como métodos para fabricarlos.

60

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

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

La presente descripción se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes. La presente descripción se refiere, además, a una célula hospedadora como la dada a conocer en la presente memoria que es una célula

presentadora de antígeno, y preferiblemente es una célula dendrítica.

La presente descripción se refiere, además, a un método para producir un péptido como el dado a conocer en la presente memoria, el cual comprende el cultivo de la célula hospedadora como la dada a conocer en la presente memoria y el aislamiento del péptido de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

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

La presente descripción se refiere, además, al método como el dado a conocer en la presente memoria, 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 288, preferiblemente la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 126, o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.

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

La presente descripción 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 como las dadas a conocer en la presente memoria, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T producidos como los dados a conocer en la presente memoria.

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

Preferiblemente, dicho medicamento está destinado a servir como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o en un anticuerpo.

La presente descripción concierne, además, al uso como el dado a conocer en la presente memoria, en que dichas células tumorales son de HCC, CRC, GB, GC, cáncer de esófago, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o células de CLL.

La presente descripción se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria, aquí denominados "dianas", que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del HCC, CRC, GB, GC, cáncer de esófago, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC y CLL. El marcador puede ser una sobrerepresentación del péptido o péptidos en cuestión, o la sobreexpresión del gen o genes correspondientes. Los marcadores también podrían ser utilizados para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia, y más preferiblemente de una inmunoterapia dirigida contra la misma diana que es identificada con el biomarcador. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo o un TCR soluble para teñir cortes histológicos del tumor con el fin de detectar la presencia de un péptido de interés unido en complejo con un MHC.

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

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

El MXRA5 codifica una de las proteínas asociadas a la remodelación de la matriz, que contiene 7 repeticiones ricas en leucinas y 12 dominios de tipo C2 similares a inmunoglobulinas relacionados con el perlecán (RefSeq, 2002). Un estudio chino identificó al MXRA5 como el segundo gen mutado con más frecuencia en el cáncer de pulmón amicrocítico (Xiong et al., 2012) En el cáncer de colon, se ha demostrado que el MXRA5 está sobreexpresado y que podría servir como biomarcador para el diagnóstico precoz y la metástasis epiploica (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el

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

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

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos conformes a la presente descripción difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

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

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

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

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-B*07 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

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

ES 2 952 959 T3

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20%
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80%
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80%
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%

(continuación)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 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
10 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.

15 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.

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

25 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.

30 Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente descripción también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural
35 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.

40 Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente descripción, 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
45 enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente descripción pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada. El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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

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

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

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

- (i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
- (ii) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y
- (iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y (iiii) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

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

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

Tal y como se ha dicho antes, la presente descripción 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 288 o una variante de las mismas que es un 88% homóloga a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288, o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la descripción tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

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

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

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288. 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 descripción. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), 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 288, 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 descripción conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín definido en los aspectos de la descripción.

Los péptidos originales (sin modificar) descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un

aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, si una leucina se reemplaza por isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

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

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

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

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

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

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

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). También es posible que los epítopos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítipo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítipo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítipo durante el procesamiento.

Los péptidos de la descripción 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 3 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la descripción:

Tabla 3: Combinaciones de las elongaciones del péptido de la descripción

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

(continuación)

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

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

5 Así pues, los epítopos de la presente descripción pueden ser idénticos a los epítopos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítopos que difieran como máximo en cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

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

15 En consecuencia, la presente descripción también proporciona péptidos y variantes de epítopos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos de unión de clase II también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

20 Por supuesto, el péptido o variante conforme a la presente descripción 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.

25 Preferiblemente, cuando los linfocitos T específicos para un péptido acorde con la presente descripción se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 μ M, más preferiblemente como máximo de alrededor de 1 nM, y aún más preferentemente como máximo de alrededor de 100 pM, y más preferentemente como máximo de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los linfocitos T de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

30 En una forma de realización preferida de la descripción el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288.

35 «Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente descripción, además de la secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288 o una variante de las mismas contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítipo para el epítipo de moléculas MHC.

40 No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente descripción en las células. En una forma de realización de la presente descripción, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "li") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente descripción 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.

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

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 y cols. (1997) (Meziere et al., 1997). Esta estrategia implica

la síntesis de pseudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (Meziere et al., 1997) demuestran que estos pseudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$ y $-\text{CH}_2\text{SO-}$. La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH_3 .

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

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

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

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

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

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

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

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

- de la descripción. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámidas, como muestra Lukas y cols. (Lukas et al., 1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxycarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhidridos salivados 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 captadores (*scavengers*) utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).
- El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).
- La purificación puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica o combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej., la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.
- El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.
- Para la identificación de los péptidos de la presente descripción, se cribó una base de datos pública de expresión de ARN (Lonsdale, 2013) que contenía unas 3000 muestras de tejido normal para detectar genes que mostraran una expresión casi nula en órganos vitales, y una escasa expresión en otros órganos importantes. Como segundo paso se procedió a identificar a los péptidos asociados al cáncer derivados de las proteínas producidas por esos genes mediante espectrometría de masas con la plataforma XPRESIDENT™, tal y como se describe en la presente memoria.
- En concreto, para seleccionar los genes de interés por medio de los datos de RNASeq contenidos en dicha base de datos se revisaron los siguientes órganos vitales: cerebro, corazón, vasos sanguíneos, pulmones e hígado. Se requirió que la mediana de las lecturas por kilobase por millón de lecturas (RPKM) de los órganos vitales fuera inferior a 2, y que el percentil del 75% fuera menor de 5 RPKM para seleccionar el gen. Si el órgano fue analizado con más de un tipo de muestra, por ejemplo diversas regiones del cerebro que fueron analizadas por separado, para el cálculo se escogió la mediana máxima y el percentil 75% máximo de los diferentes tipos de muestras. Otros órganos importantes que se tuvieron en cuenta fueron: piel, nervio, hipófisis, colon, riñón, tejido adiposo, glándula suprarrenal, vejiga urinaria, sangre entera, esófago, músculo, páncreas, glándula salival, intestino delgado, estómago, mama, bazo y glándula tiroideas. Se requirió que la RPKM mediana máxima de dichos órganos fuera inferior a 10 para elegir el gen. A otros órganos no se los consideró vitales y por eso no se aplicó ningún valor de corte para la expresión del gen. Dichos órganos fueron: cuello uterino y útero, trompa de Falopio, vagina, próstata, testículo y ovario. Con ese cribado se seleccionaron alrededor de 14.000 genes candidatos. A continuación, se analizaron los perfiles de presentación de los péptidos derivados de cada proteína. Los péptidos se consideraron interesantes si presentaban menos de cinco muestras normales en un conjunto de más de 170 muestras normales analizadas (no cancerosas), y la presentación más elevada en el tejido normal era inferior al 30% de la mediana de la señal tumoral (en el total de las muestras tumorales).
- Para seleccionar los péptidos sobrerepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación de los duplicados. El perfil juxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede después consolidar en una puntuación de sobrerepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015)

ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate) (Benjamini and Hochberg, 1995).

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de tumor primario 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.

El número de muestras son los siguientes (muestras totales/con control de calidad superado): de cáncer de páncreas N=39 (36), de cáncer de células renales N=22 (18), de cáncer colorrectal N=31 (28), de carcinoma esofágico N=14 (11), de HBP y cáncer de próstata N=53 (43), de carcinoma hepático N=15 (15), de cáncer de pulmón amicrocítico N=96 (87), de cáncer gástrico N=35 (33), de glioblastoma N=38 (27), de cáncer de mama N=2 (2), de melanoma N=5 (2), de cáncer de ovario N=21 (20), de leucemia linfocítica crónica N=5 (4), de SCLC N= 18 (17), de NHL N= 18 (18), de AML N=23 (18), de cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma N=18 (17), de cáncer de vejiga urinaria N=17 (15) y de cáncer de útero N=19 (16). Las muestras superan el control de calidad si se adquieren 5 réplicas del análisis de espectrometría de masas o la muestra se consume completamente, y si los péptidos usados para calcular el factor de normalización (es decir, presentes en replicados técnicos de la misma muestra con una varianza inferior al 50%, y presentes como mínimo en 2 muestras independientes) son al menos el 30% de todos los péptidos medidos en la muestra.

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

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 de la cuantificación diferencial sin marcador con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

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

Los complejos HLA-péptido de muestras de tumores primarios de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero y leucemia linfocítica crónica se purificaron y los péptidos asociados al HLA se aislaron y se analizaron con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (CL-EM) (véanse los ejemplos). Todos los TUMA contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica, que confirman su presentación en estos tipos de tumor.

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

Además, la plataforma para el descubrimiento de fármacos patentada XPRESIDENT® v2.x permite la cuantificación absoluta directa de las concentraciones de complejos MHC-péptido, preferentemente restringidos por HLA, en tejidos cancerosos o en otros tejidos infectados. En resumen, se calculó el número total de células a partir del contenido total de ADN de la muestra de tejido analizada. La cantidad total de péptido correspondiente a un TUMAP que estaba presente en la muestra de tejido se midió mediante nano LC-MS/MS en forma del cociente del TUMAP natural con

respecto a una cantidad conocida de una versión radiomarcada del TUMAP, el llamado patrón interno. La eficiencia del proceso de aislamiento del TUMAP se determinó introduciendo deliberadamente complejos de péptido:MHC de todos los TUMAP seleccionados en el lisado de tejido lo antes posible durante el procedimiento de aislamiento del TUMAP y procediendo a su detección por nanoCL-EM/EM una vez concluido el procedimiento de aislamiento del péptido. El recuento total de células y la cantidad de péptido total se calcularon a partir de mediciones por triplicado de cada muestra de tejido. Las eficiencias del aislamiento de cada péptido concreto se calcularon como un promedio de 10 experimentos de inoculación, cada uno con mediciones por triplicado (véanse el Ejemplo 6 y la Tabla 11).

Este análisis combinado de los datos sobre la expresión del ARN y de la espectrometría de masas dio como resultado los 288 péptidos de la presente descripción. En muchos casos el péptido solo se identificó en un escaso número de tumores. Con todo, debido a la escasa sensibilidad del análisis ordinario por espectrometría de masas, los datos del ARN aportan una base mucho más sólida para estimar la cobertura (véase el Ejemplo 2).

La presente descripción proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente el carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica, que sobrepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la descripción. La espectrometría de masas ha revelado que esos péptidos son presentados de forma natural por moléculas HLA en muestras primarias humanas de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia linfocítica crónica o cáncer de páncreas.

Se ha demostrado que el gen o genes/proteína o proteínas originarios (también denominadas «proteínas enteras» o «proteínas subyacentes») del cual derivan los péptidos aparecen notablemente sobreexpresados en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales —en la presente descripción «tejidos normales» significa que son tejidos sanos del tipo correspondiente al tumor (hígado, colon/recto, cerebro, estómago, esófago, pulmón, páncreas, riñón, próstata, ovario, piel, mama y leucocitos) o células de otros tejidos normales— lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios (véase el Ejemplo 2). Asimismo, los propios péptidos aparecen sobrepresentados intensamente en el tejido tumoral - «tejido tumoral» significa en relación con la presente descripción una muestra procedente de un paciente aquejado de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica, pero no de tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo células de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica, que presente los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente descripción han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente descripción (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4). Asimismo, cuando los péptidos están formando un complejo con el MHC correspondiente pueden ser utilizados también para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente descripción. Los métodos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la bibliografía pertinente. Así pues, los péptidos de la presente descripción 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 descripción en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

La presente descripción se refiere también a receptores de linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta («TCR alfa/beta»). Asimismo proporciona péptidos capaces de unirse a TCR y anticuerpos cuando son presentados por una molécula del MHC. La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para expresar los TCR y los péptidos de la presente descripción, así como métodos para el uso de los mismos.

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

En una forma de realización la descripción proporciona un método para producir un TCR como el descrito en la presente memoria, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora capaz de expresar el TCR en las condiciones idóneas para promover la expresión de dicho receptor.

La descripción en otro aspecto concierne a métodos acordes con la descripción, en que el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I o II que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con una célula presentadora de antígeno o bien el antígeno se carga en tetrámeros MHC de clase I o II mediante la tetramerización de los monómeros del complejo MHC de clase I o II/antígeno.

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, se consideran en general dotadas de dos “dominios”, esto es, dominios variable y constante. El dominio variable consiste en la concatenación de la región variable (V) con la región de unión (J). El dominio variable también puede incluir una región líder (L). Las cadenas beta y delta también pueden incluir una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta también pueden incluir dominios transmembrana (TM) C-terminales que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

Con respecto a los TCR gamma/delta, el término «dominio variable de cadena gamma de TCR» tal y como se emplea en la presente memoria se refiere a la concatenación de la región V de la cadena gamma del TCR sin región líder (L) (TRGV) con la región J de la cadena gamma del TCR (TRGJ), y el término «dominio constante de cadena gamma de TCR» se refiere a la región extracelular TRGC, o a una secuencia TRGC truncada en su extremo C-terminal. De modo similar, el término «dominio variable de cadena delta de TCR» se refiere a la concatenación de la región V de la cadena delta del TCR (TRDV) sin la región líder (L) con la región D/J de la cadena delta del TCR (TRDD/TRDJ), y el término «dominio constante de cadena delta de TCR» se refiere a la región extracelular TRDC, o a una secuencia TRDC truncada en su extremo C-terminal.

Los TCR de la presente descripción se unen preferentemente a un complejo de péptido-molécula de HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos, o aproximadamente 10 μ M o menos. Se prefieren más los TCR con alta afinidad dotados de una afinidad de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Algunos ejemplos sin ánimo de limitación de intervalos de afinidad de unión preferidos para los TCR de la presente descripción son: aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM; aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM; aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM; aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM; aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM; aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM; aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM; aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM; aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM; y aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM.

Tal y como se usa en relación con los TCR de la presente descripción, «unión específica» y las variantes gramaticales de dicho término se emplean para designar un TCR dotado de una afinidad de unión (KD) hacia un complejo de péptido-molécula HLA igual o inferior a 100 μ M.

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

Con o sin el susodicho enlace intercatenario introducido, los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar enlazadas mediante el enlace disulfuro nativo establecido entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Los TCR de la presente descripción pueden comprender un marcador detectable seleccionado del grupo consistente en radionúclidos, fluoróforos o biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados con un principio terapéuticamente activo, como un radionúclido, un agente quimioterápico o una toxina.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción portador de al menos una mutación de la cadena alfa y/o de al menos una mutación de la cadena beta presenta una glucosilación modificada en comparación con el TCR

no mutado.

En una forma de realización, un TCR que contiene al menos una mutación en su cadena alfa y/o en su cadena beta posee una afinidad de unión y/o una semivida de unión con un complejo de péptido-molécula HLA, que al menos duplica la de un TCR cuya cadena alfa y/o beta no está(n) mutada(s). La potenciación de la afinidad de los TCR específicos de tumor, y su aprovechamiento, depende de la existencia de una franja de afinidades óptimas de tales receptores. La existencia de tal franja se basa en las observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos a HLA-A2 presentan valores K_D que en general son unas 10 veces menores que los TCR específicos para los autoantígenos asociados a tumor restringidos a HLA-A2. Ahora sabemos que a pesar de que los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, puesto que los tumores se originan a partir de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento traduccional alterado serán detectadas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (llamados autoantígenos) no inducen necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: Los linfocitos T que expresen TCR que sean altamente reactivos contra dichos antígenos serán seleccionados negativamente en el timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solo pervivirán los linfocitos T cuyos TCR presenten una baja afinidad hacia los autoantígenos. Así pues, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente descripción hacia los péptidos acordes con la invención puede ser potenciada mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR acorde con la presente descripción, el cual comprende: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/péptido; la incubación de los PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran afinidad mediante el análisis de selección de células activado por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR conforme a la presente descripción, el cual comprende: La obtención de un ratón transgénico con los locus enteros del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el péptido de interés; la incubación de los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran avidez mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

En un aspecto, con el fin de obtener los linfocitos que expresan los TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción se clonan en vectores de expresión, como retrovirus gamma o lentivirus. Se crean los virus recombinantes y se analiza su funcionalidad, como la especificidad antigénica y la avidez funcional. A continuación se toma una alícuota del producto final para transducir a la población destinataria de linfocitos T (generalmente purificada a partir de los PBMC del paciente), que se expande antes de administrarla vía infusión al paciente.

En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen TCR de la presente descripción, los ARN del TCR se sintetizan con técnicas conocidas en la técnica, como, por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. A continuación, los ARN del TCR sintetizados *in vitro* se introducen mediante electroporación en linfocitos T CD8+ primarios procedentes de donantes sanos para reexpresar las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta específicas del tumor.

Con el fin de potenciar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden enlazarse funcionalmente con promotores potentes, como repeticiones terminales largas de retrovirus (LTR), citomegalovirus (CMV), virus de citoblastos murino (MSCV) U3, fosfoglicerato cinasa (PGK), β -actina, ubiquitina y un promotor compuesto de virus simiesco 40 (SV40)/CD43, el factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV). En una forma de realización preferida, el promotor es heterólogo con respecto al ácido nucleico que se expresa.

Además de promotores potentes, los casetes de expresión del TCR de la presente descripción pueden contener otros elementos adicionales para potenciar la expresión del transgén, como un tracto central polipurínico (cPPT), el cual promueve la traslocación nuclear de los constructos lentivíricos (Follenzi et al., 2000), o el elemento regulador postranscripcional del virus de la marmota (wPRE), que aumenta el nivel de expresión del transgén al reforzar la estabilidad del ARN (Zufferey et al., 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente descripción pueden ser codificadas por ácidos nucleicos insertados en vectores separados, o pueden serlo por polinucleótidos insertados en el mismo vector.

Alcanzar un alto nivel de expresión del TCR en la superficie celular exige que tanto las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido se transcriban en abundancia. Con ese fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción se pueden clonar en constructos bicistrónicos en un mismo vector, los cuales han demostrado ser capaces de superar ese obstáculo. La inserción de un sitio de entrada intrarribosómico del virus (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da pie a la expresión coordinada de ambas cadenas, porque ambas son generadas a partir de un único transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, asegurando así la producción equimolar de

ambas cadenas (Schmitt et al. 2009). (Schmitt et al. 2009). 2009).

Los codones de los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden ser optimizados para potenciar la expresión en la célula hospedadora. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos sean codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos «idóneos» que otros por la disponibilidad relativa de los ARNt correspondientes, entre otros factores (Gustafsson et al., 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias génicas de la TCR-alfa y la TCR-beta de modo tal que cada aminoácido sea codificado por el codón más idóneo para la expresión génica en mamíferos, así como la supresión de los motivos que provocan inestabilidad en el ARNm o de los sitios de escisión ocultos mejora notablemente la expresión génica de ambas cadenas (Scholten et al., 2006).

Además, el emparejamiento erróneo entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede derivar en la adquisición de especificidades que supongan un riesgo significativo para la autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de las cadenas del TCR puede reducir el número de moléculas disponibles para formar complejos TCR correctamente aparejados, y por tanto reducir notablemente la avidez funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball et al., 2007).

A fin de reducir el emparejamiento erróneo se puede modificar el dominio C-terminal de las cadenas introducidas de TCR de la presente descripción para promover la afinidad entre las cadenas, al tiempo que reducir las posibilidades de que las cadenas introducidas se emparejen con los TCR endógenos. Tales estrategias pueden consistir en: La sustitución de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta humanas con sus contrapartidas murinas (dominio C-terminal murinizado); la creación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína tanto en las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido (modificación con cisteína); cambiar los residuos que interactúan de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta («knob-in-hole»); y la fusión directa de los dominios variables de ambas cadenas con el CD3ζ (fusión con CD3ζ). (Schmitt et al. 2009). 2009).

En una forma de realización, se modifica con técnicas de ingeniería genética una célula hospedadora para que exprese un TCR de la presente descripción. En formas de realización preferidas, la célula hospedadora es un linfocito T humano o una célula progenitora de linfocito T humana. En algunas formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un paciente con cáncer. En otras formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un donante sano. Las células hospedadoras de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto al paciente que va a ser tratado. En una forma de realización, la hospedadora es un linfocito T gamma/delta transformado para expresar un TCR alfa/beta.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo -NH₂ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

Preferiblemente, el medicamento de la presente descripción es un agente inmunoterapéutico como una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i.d., i.m, s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido

también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente descripción estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente descripción.

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

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

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

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

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

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la descripción. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la descripción puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la descripción. 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 descripción se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

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

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

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la descripción se cultivarán

durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas descritas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

- 5 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.
- 10 La presente descripción también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente descripción. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (N.º ATCC 31343). Las
- 15 células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general pueden obtenerse de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo
- 20 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
- 25 One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente descripción se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols. (Sherman et al., 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la descripción son útiles para la preparación de péptidos de la descripción, 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 descripción 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 descripción.

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

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

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

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o

en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar por ejemplo en Teufel y cols. (Teufel et al., 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

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

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

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la descripción 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 descripción, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes más preferidos son: Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y AcM anti-CD40 o combinaciones de los anteriores.

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

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

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

Por tanto, existe otro aspecto de la descripción que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II con una forma soluble de una molécula MHC de clase I o II unida a dicho antígeno restringido a HLA; aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II unido con dicho

antígeno restringido a HLA.

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

En WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en publicaciones 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 (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003).

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

La presente descripción 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 288, o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288 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.

La presente descripción 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 288 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

La presente descripción se refiere, además, a los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o II.

La presente descripción se refiere, además, a los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288.

La presente descripción se refiere, además, a los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria, en que dichos péptidos están modificados (químicamente) y/o incluyen enlaces no peptídicos.

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

La presente descripción se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa (entera).

La presente descripción se refiere, además, al ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente descripción se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria.

La presente descripción se refiere, además, a un péptido como el dado a conocer en la presente memoria, un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria o un vector de expresión como el dado a conocer en la presente memoria para el uso en medicina, en concreto para el tratamiento del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica.

La presente descripción se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico como el dado a conocer en la presente memoria o un vector de expresión como el dado a conocer en la presente memoria.

La presente descripción concierne, además, a una célula hospedadora como la dada a conocer en la presente memoria que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.

La presente descripción concierne, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente descripción, que comprende el cultivo de la célula hospedadora como la dada a conocer en la presente memoria y el aislamiento

del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente descripción concierne, además, al método como el dado a conocer en la presente memoria en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad de antígeno suficiente con una célula presentadora de antígeno.

La presente descripción concierne, además, al método como el dado a conocer en la presente memoria, 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 288, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente descripción concierne, además, a linfocitos T activados, producidos con el método como el dado a conocer en la presente memoria, que reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como el dado a conocer en la presente memoria.

La presente descripción concierne, 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 como las dadas a conocer en la presente memoria, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los dados a conocer en la presente memoria.

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

La presente descripción concierne, además, a un uso como el dado a conocer en la presente memoria en el que dicho medicamento es una vacuna. La presente descripción concierne, además, a un uso como el dado a conocer en la presente memoria en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente descripción concierne además al uso como el dado a conocer en la presente memoria, en que dichas células tumorales son células de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica.

La presente descripción concierne, además, a biomarcadores basados en los péptidos como los dados a conocer en la presente memoria, aquí denominados «dianas», que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica. Además, la presente descripción concierne al uso de estas nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (p. ej., fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLS, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o CLL, liberación de una toxina en una célula de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o CLL que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o CLL) como los dados a conocer en la presente memoria.

Si es posible los anticuerpos de la descripción se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la descripción también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores enteros de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o CLL, como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la descripción se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido como el dado a conocer en la presente memoria, como un péptido acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 228 del polipéptido, o una variante o fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CPr, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o CLL utilizado para generar el anticuerpo como el dado a conocer en la presente memoria.

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

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

Los anticuerpos monoclonales de la descripción 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 descripción puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

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

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongsitud, 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 descripción también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón) son formas quiméricas de inmunoglobulinas, de cadenas de inmunoglobulina o de fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una

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

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

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

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

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

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

Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir el anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo, preferiblemente para tratar el HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, CP, CRC, HBP/CP, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SLCL, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC o la CLL, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), y dominios que reclutan células efectoras como un dominio anti-CD3, etc.,

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

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

10 Los anticuerpos o TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a $1 \times 10 \mu\text{M}$.

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

Otro aspecto de la presente descripción 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 durante el tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido como el dado a conocer en la presente memoria. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

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

40 La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Ljunggren y cols. (Ljunggren and Karre, 1985).

45 Preferentemente, la célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

50 Si se utiliza como antígeno un epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 288, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) utilizan linfocitos de sangre periférica autóloga (PLB) para la preparación de los linfocitos T.

60 Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (Walter et al., 2003) describen la estimulación *in vitro* de linfocitos T con células presentadoras de antígeno (aAPC), que también es una forma adecuada de generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente descripción, las aAPC se
65

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

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

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

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 288.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la descripción 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 descripción 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 descripción se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la descripción 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 descripción, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

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

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

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

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

Cualquier molécula de la descripción, 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 descripción 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 descripción o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

La presente descripción proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón

amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica y de otras neoplasias malignas.

5

La presente descripción también contempla un equipo que comprende:

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

10

- 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.

15

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

20

25

- 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).

30

- 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.

35

- Los equipos de la presente descripción pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente descripción, 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.

40

- Preferiblemente, los equipos de la descripción incluyen una formulación de la descripción 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-angiogénico, 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.

50

- 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 descripción que son componentes del presente equipo.

55

- 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.

60

- Puesto que los péptidos de la descripción se aislaron de carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón

65

microcítico, linfoma no hogdkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica, el medicamento de la descripción se usa preferiblemente para tratar esos mismos tipos de cáncer.

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente descripción también son útiles para el diagnóstico. Dado que los péptidos son generados por las células del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hogdkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica y se ha determinado que tales péptidos no están presentes o lo están en niveles bajos en los tejidos normales, pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en las biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos por medio de anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al histopatólogo de que la muestra es maligna o está inflamada o enferma en general, o puede ser utilizada como un biomarcador del carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/APC, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, linfoma no hogdkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero o leucemia linfocítica crónica. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

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

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

Figuras

La Figura 1 muestra la sobrerepresentación de varios péptidos de distintos tejidos cancerosos en comparación con los tejidos normales. Los análisis incluyeron datos de más de 170 muestras de tejido normal y 376 muestras de cáncer. Solo figuran las muestras en las que se comprobó la presentación del péptido. Figura 1A) Gen: CENPE, Péptido: KLQEKIQEL (SEQ ID N.º: 1), Tejidos de izquierda a derecha: 4 estirpes de células leucocíticas cancerosas, 1 estirpe de células de cáncer de páncreas, 1 estirpe de células de melanoma, 2 muestras de tejido normal (1 glándula suprarrenal, 1 bazo), 31 muestras de tejido de cáncer primario (1 cáncer de cerebro, 4 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres hepáticos, 16 cánceres de pulmón, 4 cánceres de ovario, 1 cáncer de recto, 1 cáncer gástrico), Figura 1B) Gen: KIF15, Péptido: QLIEKNWLL (SEQ ID N.º: 10), Tejidos de izquierda a derecha: 5 estirpes de células leucocíticas cancerosas, 1 estirpe de células de cáncer de páncreas, 1 estirpe de células de leucemia mieloide, 1 muestra de tejido normal (1 glándula suprarrenal), 29 muestras de tejido de cáncer (4 cánceres de colon, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer leucocítico, 1 cáncer hepático, 10 cánceres de pulmón, 11 cánceres de ovario), Figura 1C) Gen: HAVCR1, Péptido: LLDPKTIFL (SEQ ID N.º: 11), Tejidos de izquierda a derecha: estirpes de células de cáncer de riñón, 13 muestras de tejido de cáncer (8 cánceres de riñón, 1 cáncer hepático, 2 cánceres de pulmón, 1 cáncer de recto), Figura 1D) Gen: RPGRIP1L, Péptido: RLHDENILL (SEQ ID N.º: 13), Tejidos de izquierda a derecha: 1 estirpe de células de cáncer de riñón, 1 estirpe de células de cáncer de próstata, 1 estirpe de células de melanoma, 50 muestras de tejido de cáncer (4 cánceres de cerebro, 1 cáncer de colon, 1 cánceres de esófago, 3 cánceres de riñón, 2 cánceres hepáticos, 23 cánceres de pulmón, 7 cánceres de ovario, 2 cánceres de páncreas, 2 cánceres de próstata, 3 cánceres de recto, 1 cáncer gástrico). Las Figuras 1 E- J muestra la sobrerepresentación de varios péptidos de distintos tejidos cancerosos en comparación con los tejidos normales. Los análisis incluyeron datos de más de 320 muestras de tejido normal y 462 muestras de cáncer. Solo figuran las muestras en las que se comprobó la presentación del péptido. Figura 1E) Gen: DNAH14, Péptido: SVLEKEIYSI (SEQ ID N.º: 2); Tejidos de izquierda a derecha: 4 estirpes celulares (3 sanguíneas y 1 de páncreas), 2 tejidos normales (1 ganglio linfático y 1 tráquea), 52 tejidos cancerosos (2 cánceres de vías biliares, 1 cáncer de células mieloides, 3 leucemias leucocíticas, 5 cánceres de mama, 1 cáncer de esófago,

1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de vesícula biliar, 4 cánceres de colon, 7 cánceres de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 7 cánceres de ovario, 4 cánceres de próstata, 2 cánceres de piel, 2 cánceres de vejiga urinaria, 2 cánceres de útero y 4 cánceres de útero), Figura 1F) Gen: MAGEA3, MAGEA6, Péptido: KIWEELSVLEV (SEQ ID N.º 40); Tejidos de izquierda a derecha: 8 tejidos cancerosos (1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago y 1 cáncer de vejiga urinaria), Figura 1G) Gen: HMX1, Péptido: FLIENLLAA (SEQ ID N.º 67); Tejidos de izquierda a derecha: 7 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 2 cánceres de pulmón y 1 cáncer de útero), FIGURA 1H) Gen: CCDC138, Péptido: FLLEREQLL (SEQ ID N.º 84); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos normales (2 de células sanguíneas y 1 de piel), 24 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 3 leucemias mielocíticas, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de colon, 3 cánceres de recto, 1 cáncer de pulmón, 7 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero); Figura 1I) Gen: CLSPN, Péptido: SLLNQPKAV (SEQ ID N.º 235); Tejidos de izquierda a derecha: 13 estirpes celulares (3 de células sanguíneas, 2 de riñón y 8 de páncreas), 30 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 1 leucemia leucocítica, 2 cánceres de cerebro, 2 cánceres de mama, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de hígado, 4 cánceres de pulmón, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 2 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero), Figura 1J) Gen: SPC25, Péptido: GLAEFQENV (SEQ ID N.º 243); Tejidos de izquierda a derecha: 3 estirpes celulares (1 de células sanguíneas, 1 de riñón y 1 de páncreas), 67 tejidos cancerosos (1 cáncer de vías biliares, 4 leucemias leucocíticas, 1 leucemia mielocítica, 2 cánceres de encéfalo, 3 cánceres de mama, 4 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 2 cánceres de colon, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de hígado, 15 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 9 cánceres de ovario, 3 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria y 6 cánceres de útero).

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

Figura 2A) PRIM2 - Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa una mezcla de varios donantes), 22 muestras individuales de cáncer de próstata.

Figura 2B) CHEK1 - Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa una mezcla de varios donantes), 3 muestras individuales de colon normal, 22 muestras individuales de cáncer de colorrectal.

Figura 2C) TTC30A - Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa una mezcla de varios donantes), 30 muestras individuales de cáncer de cerebro.

Figura 2D) TRIP13 - Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa una mezcla de varios donantes), 1 muestra individual de pulmón normal, 38 muestras individuales de cáncer de pulmón.

Figura 2E) MXRA5 - Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa una mezcla de varios donantes), 9 muestras individuales de cáncer de páncreas. Las Figuras 2 F-H muestra a título de ejemplo perfiles de expresión de genes originarios de la presente descripción que se sobreexpresan con profusión o se expresan exclusivamente en diversos tipos de cáncer en un panel de tejidos normales (barras blancas) y distintas muestras de cáncer (barras negras).

Figura 2F) MMP11, MMP13 (SEQ. ID N.º 24) - Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejidos normales (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebro, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 hipófisis, 1 recto, 1 glándula salival, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo y 1 útero) y 50 muestras de cáncer (10 cánceres de mama, 4 cánceres de vías biliares, 6 cánceres de vesícula biliar, 11 cánceres de estómago, 10 cánceres de vejiga urinaria y 10 cánceres de útero), Figura 2G) HORMAD1 (SEQ ID N.º 168) - Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejidos normales (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 hipófisis, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo y 1 útero) y 41 muestras de cáncer (10 cánceres de mama, 10 cánceres de piel, 11 cánceres de pulmón amicrocítico y 10 cánceres de

pulmón microcítico), Figura 2H) IGF2BP1, IGF2BP3 (SEQ ID N.º 274) – Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejidos normales (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartilago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 hipófisis, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroidea, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo y 1 útero) y 53 muestras de cáncer (4 cánceres de vías biliares, 6 cánceres de vesícula biliar, 10 cánceres de ganglios linfáticos, 12 cánceres de ovario, 11 cánceres de esófago y 10 cánceres de pulmón).

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

Las Figuras 4A-R) muestran en la parte superior: Las intensidades medias de la señal de EM en las mediciones técnicas duplicadas se representan gráficamente como puntos para cada HLA-A*02 positivo normal (puntos grises o verdes) y cada muestra tumoral (puntos rojos) en que se ha detectado el péptido. Las muestras tumorales y normales se agrupan según el órgano de origen; las gráficas de cajas y bigotes representan la mediana, los percentiles 25 y 75 (caja) así como los valores mínimo y máximo (bigotes) de las intensidades normalizadas de la señal de muestras múltiples. Los órganos normales aparecen ordenados según categorías de riesgo (células sanguíneas, sistema cardiovascular, cerebro, hígado, pulmón; alto riesgo, puntos verde oscuro; órganos reproductores, mama, próstata: bajo riesgo, puntos grises; todos los demás órganos: riesgo medio; puntos verde claro). Parte inferior: Se muestra en forma de gráfico de espina la frecuencia de detección relativa del péptido en cada órgano. Las cifras expuestas debajo del recuadro indican el número de muestras en que se detectó el péptido del total de muestras analizadas de cada órgano (N = 298 muestras normales y N = 461 muestras tumorales). Si el péptido se detectó en una muestra, pero por razones técnicas no pudo ser cuantificado, la muestra se incluyó en esta representación de la frecuencia de detección, pero no figura en la parte superior de la figura. Tejidos de izquierda a derecha: Muestras de tejidos normales: arteria, células sanguíneas, cerebro, corazón, hígado, vena, tejido adiposo (adipos.), glándula suprarrenal (adren. gl.); médula ósea (BM), colon y recto (colorect.), duodeno (duod), esófago (esof.), vesícula biliar (gallb.), ganglio linfático (LN), páncreas, glándula paratiroidea (parathyr); peritoneo (perit.); hipófisis (pituitt.), glándula salival (sal. gland.), músculo esquelético (skel. mus), piel, intestino delgado (sm. int.), bazo, estómago, tiroides, tráquea, uréter, vejiga urinaria, mama, ovario, placenta, próstata, testículo, timo y útero. Muestras tumorales: AML: leucemia mieloide aguda; PCA: cáncer de próstata; BRCA: cáncer de mama; CLL: leucemia linfocítica crónica; CRC: cáncer colorrectal; GALB: cáncer de vesícula biliar; HCC: carcinoma hepatocelular; MEL: melanoma; NHL: linfoma no hodgkiniano; OC: cáncer de ovario; OSCAR: cáncer de esófago; OSC_GC: cáncer de esófago y gástrico; PC: cáncer pancreático; GB: glioblastoma; GC: cáncer gástrico; NSCLC: cáncer de pulmón amicrocítico; RCC: carcinoma de células renales; SCLC: cáncer de pulmón microcítico; UBC: carcinoma de vejiga urinaria; UEC: cáncer de endometrio y útero.

Las Figuras 5A-R muestran, a título de ejemplo, perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen sobreexpresados en distintas muestras oncológicas. Las muestras tumorales (puntos rojos) y normales (puntos grises y verdes) se agrupan según el órgano de origen; las gráficas de cajas y bigotes representan la mediana, los percentiles 25 y 75 (caja) así como los valores de RPKM mínimo y máximo (bigotes). Los órganos normales aparecen ordenados según las categorías de riesgo. RPKM = lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas. Muestras de tejidos normales: arteria, células sanguíneas, cerebro, corazón, hígado, vena, tejido adiposo (adipos.), glándula suprarrenal (adren. gl.); médula ósea (BM), colon y recto (colorect.), esófago (esof.), ojo, vesícula biliar (gallb.), riñón, ganglio linfático (LN), nervio, páncreas, hipófisis (pituitt.), glándula salival (sal. gland.), músculo esquelético (skel. mus), piel, intestino delgado (sm. int.), bazo, estómago, tiroides, tráquea, vejiga urinaria, mama, ovario, placenta, próstata, testículo, timo y útero. Muestras tumorales: AML: leucemia mieloide aguda; PCA: cáncer de próstata; BRCA: cáncer de mama; CLL: leucemia linfocítica crónica; CRC: cáncer colorrectal; GALB: cáncer de vesícula biliar; HCC: carcinoma hepatocelular; MEL: melanoma; NHL: linfoma no hodgkiniano; OC: cáncer de ovario; OSCAR: cáncer de esófago; PC: cáncer pancreático; GB: glioblastoma; GC: cáncer gástrico; NSCLC: cáncer de pulmón amicrocítico; RCC: carcinoma de células renales; SCLC: cáncer de pulmón microcítico; UBC: carcinoma de vejiga urinaria; UEC: cáncer de endometrio y útero.

Las Figuras 6A a M muestran resultados a título de ejemplo respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02+ en condiciones *in vitro*. Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido de SEQ ID N.º 11 (A, recuadro izquierdo), el péptido de SEQ ID N.º 14 (B, recuadro izquierdo), y respectivamente (SEQ ID N.º 157 (C), 233 (D), 85 (E), 89 (F), 155 (G), 153 (H), 264 (I), 117 (J), 253 (K), 39 (L) y 203 (M)). Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros, por ejemplo A*02/SEQ ID N.º 11 (A) o A*02/SEQ ID N.º 14 (B). Los recuadros de la derecha (por ejemplo, A y B) 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+.

Las Figuras 7A-C muestran la sobrerepresentación de varios péptidos en distintos tejidos cancerosos en

comparación con los tejidos normales. Los análisis incluyeron datos de más de 320 muestras de tejido normal y 462 muestras de cáncer. Solo figuran las muestras en las que se comprobó la presentación del péptido. Figura 7A) Gen: CCR8, Péptido: LLIPFTIFM (SEQ ID N.º 43); Tejidos de izquierda a derecha: 16 tejidos cancerosos (1 cáncer de vías biliares, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 7 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de ovario y 1 cáncer de piel); Figura 7B) Gen: CXCR5, Péptido: ILVTSIFFL (SEQ ID N.º 152); Tejidos de izquierda a derecha: 6 tejidos normales (1 ganglio linfático y 5 bazo), 16 tejidos cancerosos (8 leucemias leucocíticas y 8 cánceres de ganglios linfáticos); Figura 7C) Gen: CYSLTR1, Péptido: VILTSSPFL (SEQ ID N.º 156); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos normales (1 pulmón, 1 ganglio linfático y 1 bazo), 11 tejidos cancerosos (2 cánceres de mama, 5 leucemias leucocíticas, 3 cánceres de ganglios linfáticos y 1 cáncer de células mieloides).

Ejemplos

EJEMPLO 1

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de los pacientes procedían de Asterand (Detroit, EE.UU. y Royston, Herts, Reino Unido); Hospital Universari Vall d'Hebron (Barcelona, España); BioServe (Beltsville, Maryland, EE.UU.); Center for cancer immune therapy (CCIT), Herlev Hospital (Herlev); Geneticist Inc. (Glendale, California, EE.UU.); Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Hospital Universitario de Múnich; Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); Universidad de la Ciudad de Osaka (OCU); ProteoGenex Inc., (Culver City, California, EE.UU.); Hospital Universitario de Tubinga. Los tejidos normales se obtuvieron de Bio-Options Inc, California, EE.UU.; BioServe, Beltsville, Maryland, EE.UU.; Capital BioScience Inc, Rockville, Maryland, EE.UU.; Geneticist Inc., Glendale, California, EE.UU.; Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE.UU.; Hospital Universitario de Tubinga.

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

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

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

Análisis por espectrometría de masas

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

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

cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. El perfil superpone muestras de cáncer con muestras de tejido normal de referencia. En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerrepresentados a modo de ejemplo. La Tabla 4 ofrece un resumen general de la presentación de los péptidos seleccionados en diversas entidades.

Tabla 4: Visión general de la presentación del péptido seleccionado en diversas entidades. El péptido se consideró interesante en una entidad si se sobrepresentaba en muestras de cáncer de esta entidad en comparación con los tejidos normales. MEL = melanoma, BRCA = cáncer de mama, OSCAR = carcinoma de esófago. La HBP incluye tanto la hiperplasia benigna de próstata como el cáncer de páncreas.

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades de especial interés
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC

EJEMPLO 2

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

La sobrerrepresentación 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. En la presente descripción, se comprobó que la expresión en tejido normal de todos los genes originarios era mínima a juzgar por los datos obtenidos de la susodicha base de datos de expresión de ARN que comprendía cerca de 3000 muestras de tejido normal. Se sumaron otros análisis de ARN de los tejidos normales y tumorales en el caso de algunas entidades tumorales (carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/CPr) para estimar la cobertura diana en la población de pacientes aquejados de los tumores respectivos.

Fuentes de ARN y preparación

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

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

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos para los experimentos de RNASeq se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU), BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania), BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.), Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE. UU.), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Nápoles, Italia); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.) y Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania).

El ARN total procedente de tejidos tumorales para los experimentos de RNASeq se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EE. UU.), BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, RU), Hospital Universitario de Bonn (Bonn, Alemania), Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania) y Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

Experimentos con micromatrices

La cobertura se estimó con el análisis de los perfiles de expresión del ARN (micromatrices Affymetrix) de 30 muestras de glioblastoma, 16 de cáncer colorrectal, 56 de cáncer de células renales, 12 de carcinoma hepatocelular, 38 de cáncer de pulmón amicrocítico, 11 de cáncer de páncreas, 34 de cáncer gástrico y 20 de cáncer de próstata.

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con

micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes preprogramados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0. En la Figura 2 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente descripción que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, HBP/CPr. La ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ofrece un resumen de la cobertura de los genes seleccionados.

Experimentos de RNAseq

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

En las Figuras 2 F-H se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente descripción que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el linfoma no hodgkiniano (NHL), el cáncer de mama, el cáncer de vesícula biliar (GBC), el colangiocarcinoma (CCC), el melanoma (MEL), el cáncer de ovario (OC), el cáncer de esófago (OSCAR), el cáncer pulmón microcítico (SCLC), el cáncer de vejiga urinaria (UBC) y el cáncer de endometrio y útero (UEC).

EJEMPLO 3

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente descripción, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 47 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la descripción, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). 6A y B).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

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

Los linfocitos CD8+ o PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomycin 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorf, 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).

La fabricación de las microperlas tapizadas con pMHC/anti-CD28, la estimulación 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.

- 5 El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 µm de diámetro recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE.UU.).
- 10 Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV, SEQ ID N.º 289) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 290), respectivamente.

- 15 Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 µl en presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadió 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1x10⁶ linfocitos T CD8+ con 2x10⁵ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-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 LSR II 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).
- 20
- 25
- 30

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos

- 35 En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En las Figuras 3 y 6 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de 15 péptidos de la descripción tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes.

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

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

EJEMPLO 5

Ensayo de unión a MHC

- 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 (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).
- 60
- 65

Se incubaron a temperatura ambiente placas de 96 pocillos MAXISorp (NUNC) hasta el día siguiente con una solución de tapizado consistente en estreptavidina 2 µg/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%. Los monómeros replegados de HLA-A*02:01/MLA-001 sirvieron como patrones, abarcando el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio 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 incubaron con anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP 2 µg/ml durante 1 h a 37 °C, se lavaron de nuevo y se revelaron con solución de TMB que se detuvo con NH₂SO₄. La absorción se midió a 450 nm. Por norma general, para la creación y producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, o de receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos se prefieren los péptidos candidato que muestran un alto porcentaje de intercambio (preferentemente superior al 50%, aún más preferentemente superior al 75%), puesto que presentan una afinidad suficiente hacia las moléculas del MHC que evita la disociación de los complejos MHC.

Tabla 5: niveles de unión a MHC de clase I

Según el porcentaje del intercambio de péptidos, la unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I al HLA-A*02:01 varió entre: ≥ 10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; 75% = ++++		
SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
25	LLWGHPRVALA	+++

EJEMPLO 6

Tabla 6: Péptido preferido conforme a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	Código del péptido
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003

Cuantificación absoluta de los péptidos asociados a tumor presentados en la superficie celular

La generación de ligandos, como son anticuerpos y/o TCR, es un proceso laborioso, que solo es factible para un número concreto de dianas escogidas. En el caso de los péptidos específicos de tumores o asociados a ellos, los criterios de selección incluyen, entre otros, la exclusividad de la presentación y la densidad que alcanza el péptido cuando se presenta en la superficie celular. Además del aislamiento y de la cuantificación relativa de los péptidos que se describen en la presente memoria, los inventores analizaron el número absoluto de copias del péptido por célula tal y como se ha descrito. La cuantificación de las copias de TUMAP por célula en muestras de tumores sólidos requiere la cuantificación absoluta del TUMAP aislado, la eficiencia del proceso de aislamiento del TUMAP y el recuento de células en la muestra de tejido analizada.

Cuantificación del péptido mediante nanoCL-EM/EM

Para una cuantificación precisa de los péptidos mediante la espectrometría de masas se trazó una curva de calibración para cada péptido con el método del patrón interno. El patrón interno es una variante de cada péptido marcada por partida doble con isótopos, es decir, que en la síntesis del TUMAP se incorporan dos aminoácidos marcados con isótopos. Solo difiere del péptido asociado a tumor en la masa, sin ninguna diferencia en cuanto a otras propiedades fisicoquímicas (Anderson et al., 2012). El patrón interno fue introducido deliberadamente en cada muestra de EM y todas las señales de EM se normalizaron con respecto a la señal de EM de este patrón interno para compensar las posibles variaciones técnicas en los diversos análisis espectrométricos.

Las curvas de calibración se prepararon como mínimo en tres matrices distintas, a saber, eluatos de péptidos de HLA procedentes de muestras naturales similares a las muestras de EM ordinarias, y cada preparación se sometió a análisis de EM por duplicado. Para la evaluación, las señales de EM se normalizaron respecto a la señal del patrón interno y la curva de calibración se calculó con una regresión logística.

Para la cuantificación de los péptidos asociados a tumor en muestras de tejido, las correspondientes muestras también se inoculaban con el patrón interno; las señales de EM se normalizaron respecto al patrón interno y se cuantificaron utilizando la curva de calibración del péptido.

Eficiencia del aislamiento de los complejos de péptido-MHC

Como en todo proceso de purificación de proteínas, el aislamiento de las proteínas a partir de las muestras de tejido conlleva cierta pérdida de la proteína de interés. Para determinar la eficiencia en el aislamiento de los TUMAP, se crearon complejos de péptido-MHC de todos los TUMAP que habían sido seleccionados para su cuantificación absoluta. A fin de poder distinguir entre los complejos aportados por la inoculación deliberada y los complejos naturales de péptido-MHC se usaron versiones de los TUMAP marcadas con un solo isótopo, es decir, durante la síntesis de

estos TUMAP se introdujo un aminoácido marcado con un solo isótopo. Estos complejos se vertieron en lisados tisulares recién preparados (enriquecimiento), es decir, en cuanto fue posible a lo largo del procedimiento de aislamiento de los TUMAP, y después se capturaron del mismo modo que los complejos naturales de péptido-MHC con el subsiguiente proceso de purificación por afinidad. Así pues, medir la recuperación de los TUMAP provistos de un solo marcador permite extraer conclusiones acerca de la eficiencia del aislamiento de los diferentes TUMAP naturales.

La eficiencia del aislamiento se analizó en un pequeño conjunto de muestras y resultó comparable entre esas muestras de tejido. En cambio, la eficiencia del aislamiento difiere entre los diversos péptidos. Este hecho sugiere que la eficiencia del aislamiento, si bien ha sido determinada con un pequeño número de muestras de tejido, se puede extrapolar a cualquier otra preparación de tejido. Con todo, es necesario analizar individualmente cada TUMAP puesto que la eficiencia de aislamiento podría no ser extrapolable de un péptido a otros.

Determinación del recuento de células en tejido sólido congelado

Con el fin de determinar el número de células contenidas en las muestras de tejido que eran objeto de la cuantificación absoluta del péptido, los inventores recurrieron al análisis del contenido de ADN. Este método es aplicable a una amplia gama de muestras de diverso origen y, lo que es más relevante, a muestras congeladas (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Durante el protocolo de aislamiento del péptido, la muestra de tejido se procesa para convertirla en un lisado homogéneo, del cual se toma una pequeña alícuota de lisado. La alícuota se divide en tres partes, de las cuales se aísla el ADN (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). El contenido total de ADN de cada aislamiento de ADN se cuantifica usando un ensayo de cuantificación del ADN por fluorescencia (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) que se efectúa como mínimo por duplicado.

Con el fin de calcular el número de células, se ha generado una curva patrón de ADN a partir de alícuotas de células sanguíneas sanas aisladas, con un intervalo de distintos recuentos de células definidos. La curva patrón se usa para calcular el contenido total de células a partir del contenido total de ADN resultante de cada aislamiento de ADN. A continuación, se extrapola el número total medio de células de la muestra de tejido usada para el aislamiento del péptido teniendo en cuenta el volumen conocido de las alícuotas de lisado y el volumen total del lisado.

Copias del péptido por célula

Con los datos de los susodichos experimentos, los inventores calcularon el número de copias de TUMAP por célula dividiendo el número total de péptidos por el número total de células de la muestra, y dividiéndolo a continuación por la eficiencia del aislamiento.

Lista de referencias bibliográficas

- Adelaide, J. et al., Cancer Res 67 (2007): 11565-11575
 Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. 11 (2011): 124
 Allison, J. P. et al., Science 270 (1995): 932-933
 American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
 Ampie, L. et al., Front Oncol. 5 (2015): 12
 Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012): 891-902
 Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res 11 (2012): 1868-1878
 Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006): 1805-1814
 Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011): 306-315
 Aung, P. P. et al., Oncogene 25 (2006): 2546-2557
 Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. 10 (2004): 4699-4708
 Baba, T. et al., Eur.J Cardiothorac.Surg. 43 (2013): 759-764
 Bahnassy, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014): 18240-18248
 Banachereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274
 Band, A. M. et al., J Mammary.Gland.Biol Neoplasia. 16 (2011): 109-115
 Bankovic, J. et al., Lung Cancer 67 (2010): 151-159
 Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001): 2276-2282
 Beaty, T. H. et al., Hum.Genet. 132 (2013): 771-781
 Beggs, J. D., Nature 275 (1978): 104-109
 Bell, J. L. et al., J Clin Oncol 33 (2015): 1285-1293
 Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013): 2657-2675
 Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), 57 (1995): 289-300
 Berger, C. et al., Curr.Mol.Med. 13 (2013): 1229-1240
 Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
 Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b) Bhan, S. et al., Oncol Rep. 28 (2012): 1498-1502
 Bode, P. K. et al., Mod.Pathol. 27 (2014): 899-905
 Bogush, T. A. et al., Antibiot.Khimioter. 54 (2009): 41-49

- Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* 125 (2014): 293-299
 Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003): 707-711
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
 Bray, F. et al., *Int J Cancer* 132 (2013): 1133-1145
 5 Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997): 1594-1599
 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43
 Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 2817-2825
 Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 5902-5908
 Caballero, O. L. et al., *PLoS.One.* 5 (2010)
 10 Carballido, E. et al., *Cancer Control* 19 (2012): 54-67
 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004): 345-357
 Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* 59 (2007): 561-574
 Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-1223
 Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* 119 (2014): 476-482
 15 Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 11 (2003): 145-148
 Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* 102 (2011b): 2191-2198
 Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* 11 (2013c): 85-91
 Chen, Y. T. et al., *Cancer Immun.* 5 (2005): 9
 Cierna, Z. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014): 472
 20 Ciruelos Gil, E. M., *Cancer Treat.Rev* 40 (2014): 862-871
 Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* 16 (2003a): 324-332
 Cohen, C. J. et al., *J Immunol* 170 (2003b): 4349-4361
 Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972): 2110-2114
 Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
 25 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738
 Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 5495-5500
 Coulie, P. G. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 33-42
 Counter, C. M. et al., *Blood* 85 (1995): 2315-2320
 Cuadros, T. et al., *Cancer Res* 74 (2014): 1416-1428
 30 Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* 49 (2013): 2034-2047
 Dalerba, P. et al., *Int.J Cancer* 93 (2001): 85-90
 De, Plaen E. et al., *Immunogenetics* 40 (1994): 360-369
 Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
 Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003): 2197-2207
 35 Downie, D. et al., *Clin Cancer Res.* 11 (2005): 7369-7375
 Du, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014): 6324-6335
 Duan, Z. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 2778-2785
 Ek, S. et al., *Cancer Res* 62 (2002): 4398-4405
 Emens, L. A., *Expert.Rev.AnticancerTher.* 12(2012): 1597-1611
 40 Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* 6 (2014): 716-737
 Estey, E. H., *Am.J Hematol.* 89 (2014): 1063-1081
 Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296
 Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
 45 Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* 87 (2012): 24-29
 Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.il.S.A* 98 (2001): 8809-8814
 Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* 31 (2009): 819-823
 Frasor, J. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 418 Pt 3 (2015): 235-239
 Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* 7 (2015): 65-79
 50 Fujiyama, T. et al., *J Dermatol.Sci.* 75 (2014): 43-48
 Fukuyama, T. et al., *Cancer Res.* 66 (2006): 4922-4928
 Fuqua, S. A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 144 (2014): 11-19
 Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996): 1096-1103
 Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* 20 Suppl 3 (2013): S636-S643
 55 Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* 7 (2006): 325
 Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006): 383-393
 Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* 24 (2010): 798-805
 Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* 29 (2006): 95-103
 Gibbs, P. et al., *Melanoma Res* 10 (2000): 259-264
 60 Gnjjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
 Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
 Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014): 191-200
 Grah, J. J. et al., *Tumori* 100 (2014): 60-68
 Granziero, L. et al., *Blood* 97 (2001): 2777-2783
 65 Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4th (2012)
 Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* 2nd (2014)

- Gu, X. et al., *Sci.Rep.* 4 (2014): 6625
 Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* 142 (2008): 606-609
 Hall, R. D. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 22-31
 Hamilton, K. E. et al., *Mol.Cancer Res* 13 (2015): 1478-1486
 5 Han, L. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014): 6734-6742
 Hanagiri, T. et al., *Anticancer Res.* 33 (2013): 2123-2128
 Harig, S. et al., *Blood* 98 (2001): 2999-3005
 Hasegawa, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* 122 (1998): 551-554
 Hayashi, S. I. et al., *Endocr.Relat Cancer* 10 (2003): 193-202
 10 Hennard, C. et al., *J Pathol.* 209 (2006): 430-435
 Herbert, N. et al., *J Immunol.* 185 (2010): 902-916
 Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* 31 (2013): 999-1008
 Hiramoto, T. et al., *Oncogene* 18 (1999): 3422-3426
 Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* 112 (2008): 1471-1479
 15 Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* 8 (2002): 3369-3376
 Hsu, H. C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 329 (2005): 1108-1117
 Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014): 883-893
 Huang, X. et al., *Cell Prolif.* 48 (2015b): 593-599
 Hui, L. et al., *Oncol Rep.* 34 (2015): 2627-2635
 20 Hussein, Y. M. et al., *Med.Oncol* 29 (2012): 3055-3062
 Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
 Ioannidis, P. et al., *Anticancer Res* 23 (2003): 2179-2183
 Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009): 66-73
 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611 -4615
 25 Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med.* 3(2011): 95ra73
 Kang, C. Y. et al., *J Gastrointest.Surg.* 18 (2014): 7-15
 Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* rd (2000)
 Kim, Y. D. et al., *Int.J Mol.Med.* 29 (2012): 656-662
 Kobayashi, H. et al., *Oncol Lett.* 10 (2015): 612-618
 30 Koido, S. et al., *World J Gastroenterol.* 19 (2013): 8531-8542
 Krackhardt, A. M. et al., *Blood* 100 (2002): 2123-2131
 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
 Lederer, M. et al., *Semin.Cancer Biol* 29 (2014): 3-12
 Lee, M. Y. et al., *J Cell Physiol* 224 (2010): 17-27
 35 Lee, W. C. et al., *J Immunother.* 28 (2005): 496-504
 Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 030/099, (2014)
 Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005): 104-113
 Leonetti, M. D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109 (2012): 19274-19279
 Li, H. et al., *Bull.Cancer* 99 (2012): E26-E33
 40 Li, M. et al., *Clin Cancer Res* 11 (2005): 1809-1814
 Li, W. M. et al., *J Surg.Oncol* (2016)
 Li, Y. et al., *Cancer Epidemiol.* 39 (2015): 8-13
 Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 980-987
 Lin, J. et al., *Clin Cancer Res* 10 (2004): 5708-5716
 45 Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013): 740-744
 Lisitskaia, K. V. et al., *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* (2010): 34-37
 Liu, X. et al., *Int.Immunopharmacol.* 25 (2015): 416-424
 Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985): 1745-1759
 Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* 359 (2008): 378-390
 50 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
 Lonsdale, J., *Nat.Genet.* 45 (2013): 580-585
 Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
 Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* 3rd (2004)
 Luo, C. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1288-1297
 55 Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* 8 (2012): 1179-1191
 Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 51 (2002): 637-644
 Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015): 3180-3196
 Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* 41 (2015): 114-121
 Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014): 1657-1666
 60 Maus, M. V. et al., *Blood* 123 (2014): 2625-2635
 Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* 34 (2006): 44-53
 Mayr, C. et al., *Blood* 105 (2005): 1566-1573
 Mehta, A. et al., *Breast* 23 (2014): 2-9
 Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
 65 Miyagi, Y. et al., *Clin Cancer Res* 7 (2001): 3950-3962
 Miyoshi, Y. et al., *Med.Mol.Morphol.* 43 (2010): 193-196

- Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* 83 (2008): 584-594
 Mongan, N. P. et al., *Mol.Carcinog* 45 (2006): 887-900
 Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129
 Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
 5 Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443
 Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res* 8 (2002): 2044-2051
 Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008): 51-61
 Mueller, L. N. et al., *Proteomics* 7 (2007): 3470-3480
 Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
 10 Murray, G. I. et al., *Histopathology* 57 (2010): 202-211
 National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
 Noubissi, F. K. et al., *J Invest Dermatol.* 134 (2014): 1718-1724
 Oehlrich, N. et al., *Int.J Cancer* 117 (2005): 256-264
 Okuno, K. et al., *Exp.Ther Med.* 2 (2011): 73-79
 15 Ottaviani, S. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 55 (2006): 867-872
 Otte, M. et al., *Cancer Res* 61 (2001): 6682-6687
 Ozeki, N. et al., *Int.J Mol.Sci.* 17 (2016)
 Pai, V. P. et al., *Breast Cancer Res* 11 (2009): R81
 Palmer, D. H. et al., *Hepatology* 49 (2009): 124-132
 20 Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* 14 (2012): 433-440
 Perez, C. A. et al., *Expert.Rev Anticancer Ther.* 11 (2011): 1599-1605
 Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 289-297
 Pineda, C. T. et al., *Cell* 160 (2015): 715-728
 Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
 25 Piebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
 Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* 365 (2011): 725-733
 Prasad, M. L. et al., *Head Neck* 26 (2004): 1053-1057
 Qian, Z. et al., *Mol.Cancer Res* 12 (2014): 335-347
 30 Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
 Raman, J. D. et al., *Carcinogenesis* 27 (2006): 499-507
 Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
 Reck, M., *Ann.Oncol* 23 Suppl 8 (2012): viii28-viii34
 RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
 35 Reinisch, C. M. et al., *Int.J Exp.Pathol.* 92 (2011): 326-332
 Reinisch, W. et al., *J Immunother.* 25 (2002): 489-499
 Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* 140 (2015): 329-333
 Ries, J. et al., *Int.J Oncol* 26 (2005): 817-824
 Rinaldi, A. et al., *Pathobiology* 77 (2010): 129-135
 40 Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* 20 (2008): 300-306
 Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74
 Risinger, J. I. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1713-1719
 Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921
 Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* 1 (2006): 1120-1132
 45 S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-0100L, (2013)
 S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 020/007, (2011)
 S3-Leitlinie maligne Ovarialtumor, 032-0350L, (2013)
 S3-Leitlinie Mammakarzinom, 032-0450L, (2012)
 S3-Leitlinie Melanom, 032-0240L, (2013)
 50 S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 043/0220L, (2014)
 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491
 Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* 2 (2013): e26662
 Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* 22 (2004): 1389-1397
 Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 1164-1170
 55 Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576
 Shahzad, M. M. et al., *Cancer Lett.* 330 (2013): 123-129
 Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
 Sherman-Baust, C. A. et al., *Cancer Cell* 3 (2003): 377-386
 Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* 10 (2004): 1146-1151
 60 Showel, M. M. et al., *FIOOPRime.Rep.* 6 (2014): 96
 Siegel, S. et al., *Blood* 102 (2003): 4416-4423
 Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* 85 (2013): 9536-9542
 Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195
 Skandalis, S. S. et al., *Matrix Biol* 35 (2014): 182-193
 65 Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094
 Smith, M. J. et al., *Br.J Cancer* 100 (2009): 1452-1464

- Son, M. Y. et al., *Stem Cells* 31 (2013): 2374-2387
 Springelkamp, H. et al., *Genet.Epidemiol.* 39 (2015): 207-216
 Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* 24 Suppl 6 (2013): vi51-vi56
 Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163
 5 Su, Z. et al., *Cancer Res.* 63 (2003): 2127-2133
 Sun, H. et al., *J BUON.* 20 (2015): 296-308
 Szajnik, M. et al., *Gynecol.Obstet.(Sunnyvale.) Suppl* 4 (2013): 3
 Szarvas, T. et al., *Int J Cancer* 135 (2014): 1596-1604
 Takayama, T. et al., *Cancer* 68(1991): 2391-2396
 10 Takayama, T. et al., *Lancet* 356 (2000): 802-807
 Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* 10(1997): 1113-1117
 Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762
 Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 23 (2014): 1985-1996
 Thorsen, K. et al., *Mol Cell Proteomics.* 7 (2008): 1214-1224
 15 Tian, X. et al., *J Transl.Med.* 13 (2015): 337
 Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 32-42
 Tradonsky, A. et al., *Am.J Clin Pathol.* 137 (2012): 918-930
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014): 641-645
 Urgard, E. et al., *Cancer Inform.* 10 (2011): 175-183
 20 van der Bruggen, P. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 51-64
 van, Duin M. et al., *Haematologica* 96 (2011): 1662-1669
 Velinov, N. et al., *Khirurgiia (Sofia)* (2010): 44-49
 Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003): 4974-4978
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261
 25 Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* 5 (2013): 544-548
 Wang, Y. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 207-214
 Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 7099-7109
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423
 Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* 12 (2001): 267-278
 30 Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* 83 (2008): 589-601
 World Cancer Report, (2014)
 Wu, Z. Y. et al., *Scand.J Immunol.* 74 (2011): 561-567
 Xie, X. et al., *Oncol Lett.* 7 (2014): 1537-1543
 Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* 33 (2012): 1797-1805
 35 Xu, J. et al., *J Mol.Biol* 377 (2008): 28-46
 Xu, L. et al., *Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi.* 14 (2011): 727-732
 Xu, X. et al., *Exp.Mol.Pathol.* 97 (2014): 579-584
 Xu, Y. et al., *Sci.Rep.* 5 (2015): 12104
 Yakimchuk, K. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 375 (2013): 121-129
 40 Yamada, R. et al., *Tissue Antigens* 81 (2013): 428-434
 Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007): 1033-1040
 Yao, J. et al., *Cancer Immunol.Res.* 2 (2014): 371-379
 Yin, B. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014a): 2934-2941
 Yu, J. et al., *Gut* 64 (2015): 636-645
 45 Yu, W. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 264 (2012): 73-83
 Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* 16 (2009): 1711-1719
 Zamuner, F. T. et al., *Mol.Cancer Ther.* 14 (2015): 828-834
 Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997): 4570-4577
 Zhan, W. et al., *Clin Res Hepatol.Gastroenterol.* (2015)
 50 Zhang, H. et al., *Carcinogenesis* 35 (2014): 1863-1871
 Zhang, J. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 42040-42052
 Zhang, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8 (2015): 541-550
 Zhang, X. et al., *Int.J Oncol* (2016)
 Zhao, H. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 10 (2002): 100-102
 55 Zou, T. T. et al., *Oncogene* 21 (2002): 4855-4862
 Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
 Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
 Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May; 119(2): 135-45.
 Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
 60 Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331-2338.
 Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240-1248.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en la SEQ ID N.º 25, y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido tiene una longitud total de 11 a 16 aminoácidos.
2. El péptido acorde con la reivindicación 1, en que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 25.
3. El péptido acorde con la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.
4. Receptor de linfocito T, preferentemente un receptor de linfocito T recombinante, soluble o unido a membrana, que es reactivo con un ligando de HLA que está formando un complejo con una molécula del HLA, y dicho ligando tiene una identidad de al menos el 88% con una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 25, y preferentemente consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 25.
5. Anticuerpo, en particular un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 25 cuando está unido a una molécula del MHC.
6. Un ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un TCR acorde con la reivindicación 4, o un anticuerpo acorde con la reivindicación 5, opcionalmente enlazado a una secuencia promotora heteróloga, o un vector de expresión que exprese dicho ácido nucleico.
7. Célula hospedadora recombinante que comprende el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, o el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, en que dicha célula hospedadora es preferentemente una célula presentadora de antígeno como una célula dendrítica, o en que dicha célula hospedadora es preferentemente un linfocito T o una célula NK.
8. Método para producir el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o para producir el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4, o un anticuerpo acorde con la reivindicación 5, método que comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la reivindicación 8 que presenta el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o que expresa el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 7, y el aislamiento del péptido o del TCR o del anticuerpo a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
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 consistente en una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 25.
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 cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
11. Composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo consistente en el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.
12. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 5 para el uso en medicina, preferentemente para el uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer, o para el uso en la fabricación de un medicamento contra el cáncer.
13. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4 para el uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer, o para el uso en la fabricación de un medicamento contra el cáncer acorde con la reivindicación 13, en que dicho cáncer es seleccionado a partir del grupo consistente en: carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer de esófago, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (CRC), hiperplasia benigna de próstata (HBP), cáncer de próstata (CPr), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC),

cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer de útero (UEC), y otros tumores que muestran sobreexpresión de una proteína de la cual deriva el péptido de la SEQ ID N.º 25.

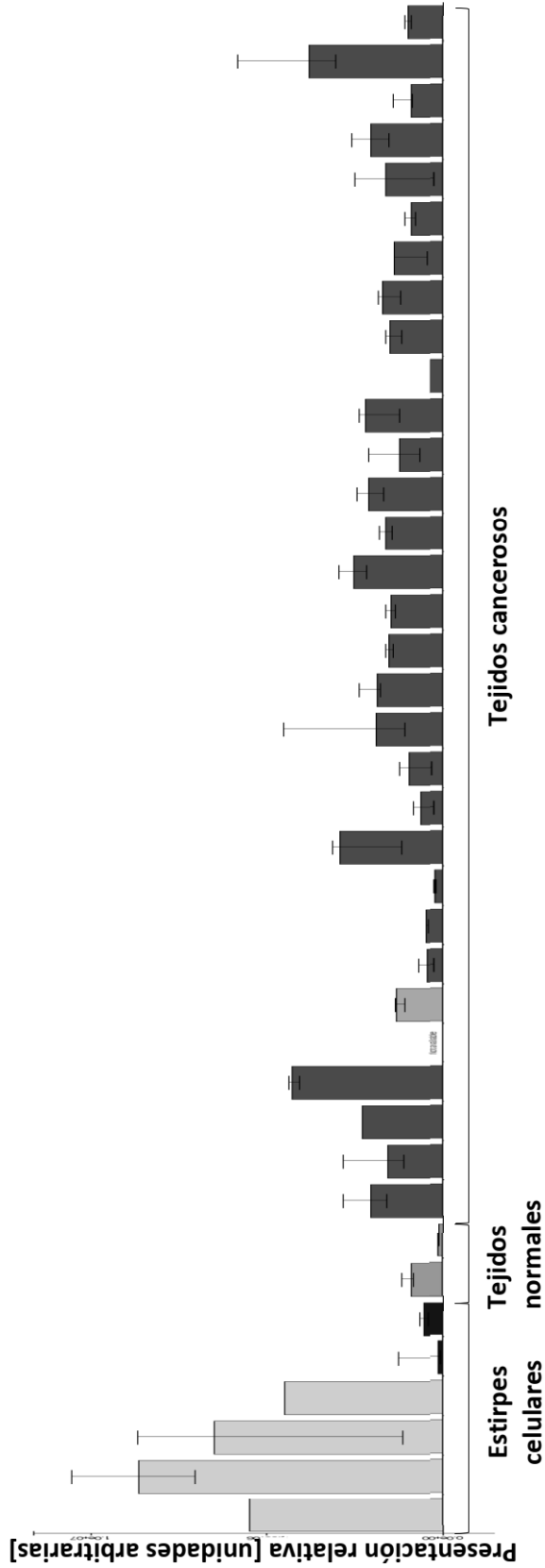
14. Un equipo que comprende:

- 5 a) un envase que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4, en forma de solución o liofilizada;
- 10 b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o una 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
- 15 d) opcionalmente, además, comprende uno o más de los componentes siguientes: (iii) un tampón, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, o (vii) una jeringa.

Nota:

El documento completo que incluye las tablas de referencia y el listado de secuencias se puede descargar de la página web de la EPO (<https://register.epo.org>)

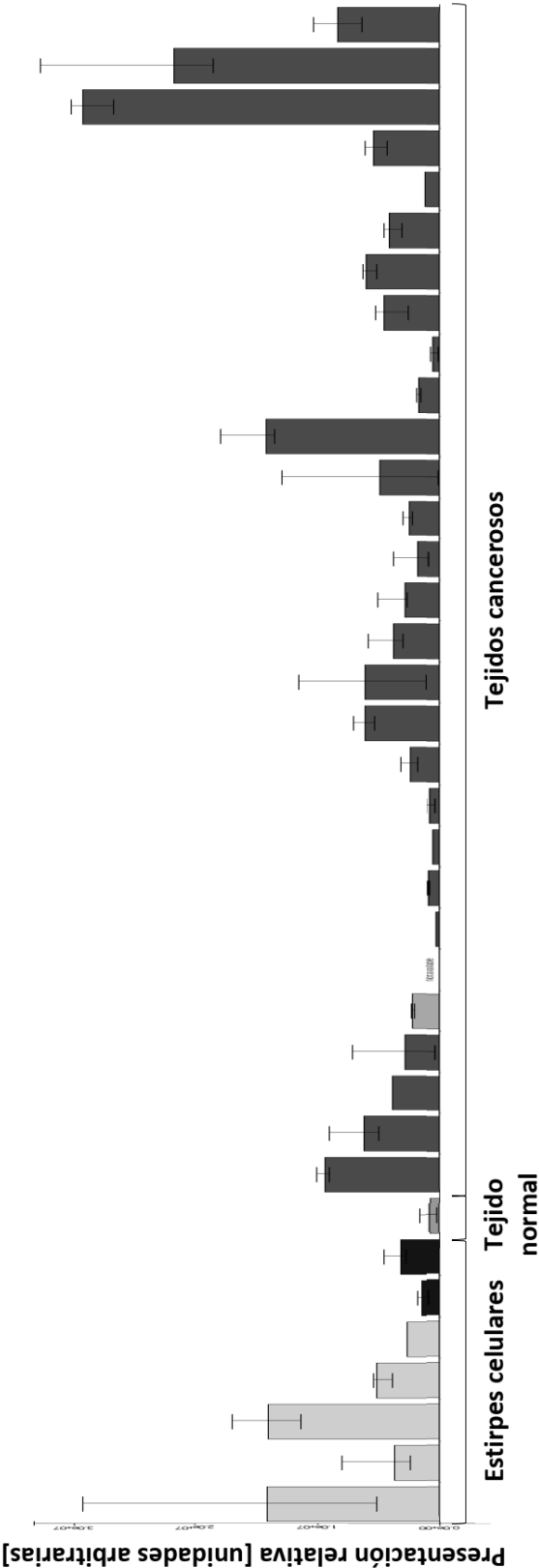
Figura 1A - Péptido: KLQEKIQEL (A*02:01)



Péptido detectado en

4 estirpes de células leucocíticas cancerosas, 1 estirpe de células de cáncer de páncreas, 1 estirpe de células de melanoma, 2 muestras de tejido normal (1 glándula suprarrenal, 1 bazo), 31 muestras de tejido canceroso (1 cáncer de cerebro, 4 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres hepáticos, 16 cánceres de pulmón, 4 cánceres de ovario, 1 cáncer de recto y 1 cáncer gástrico) (de izquierda a derecha)

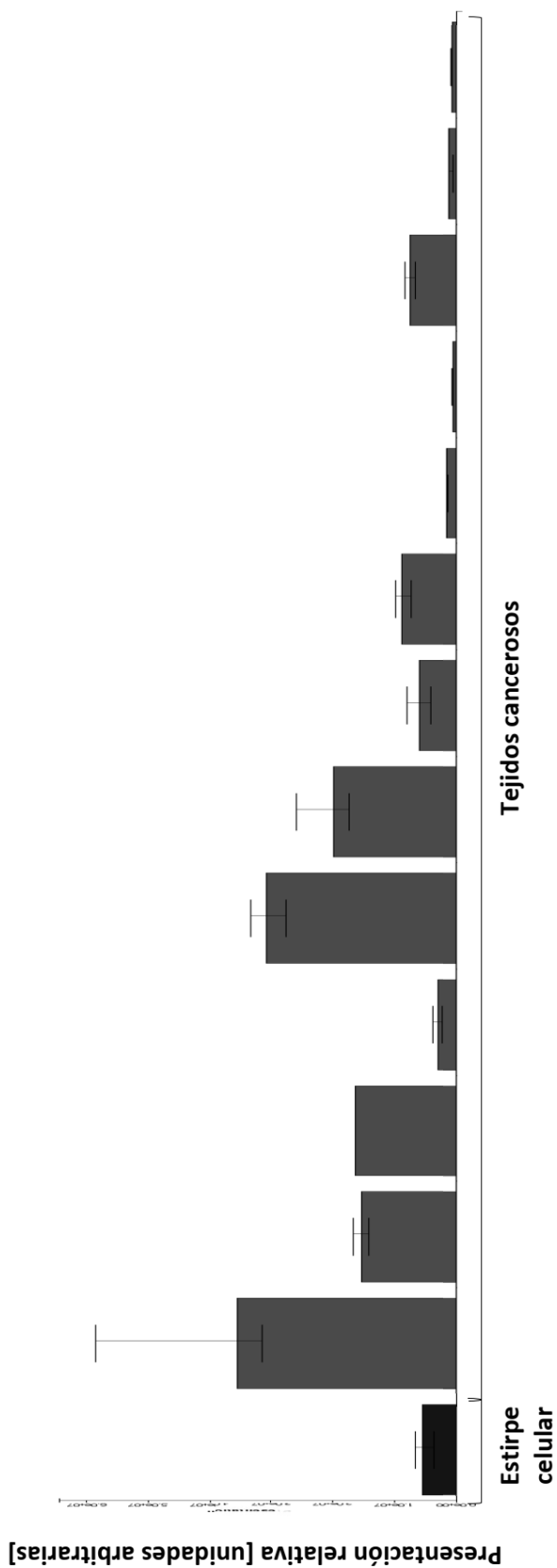
Figura 1B - Péptido: QLIEKNWLL (A*02:01)



Péptido detectado en

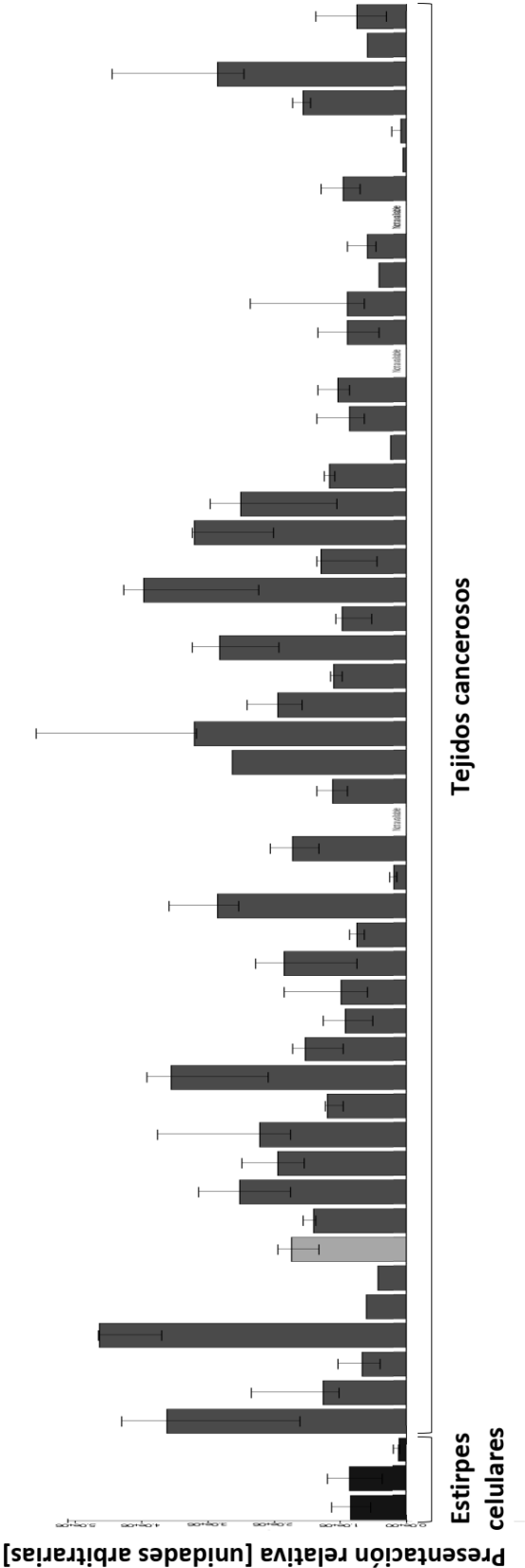
5 estirpes de células leucocíticas cancerosas, 1 estirpe de células de cáncer de páncreas, 1 estirpe de células de leucemia mieloide, 1 muestra de tejido normal (1 glándula suprarrenal), 29 muestras de tejido canceroso (4 cánceres de colon, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer leucocítico, 1 cáncer hepático, 10 cánceres de pulmón y 11 cánceres de ovario) (de izquierda a derecha)

Figura 1C - Péptido: LLDPKTIFL (A*02:01)



Péptido detectado en
 1 estirpe de células de cáncer de riñón, 0 tejidos normales, 13 tejidos cancerosos (8 cánceres de riñón, 1 cáncer hepático, 2 cánceres de pulmón y 2 cánceres de recto) (de izquierda a derecha)

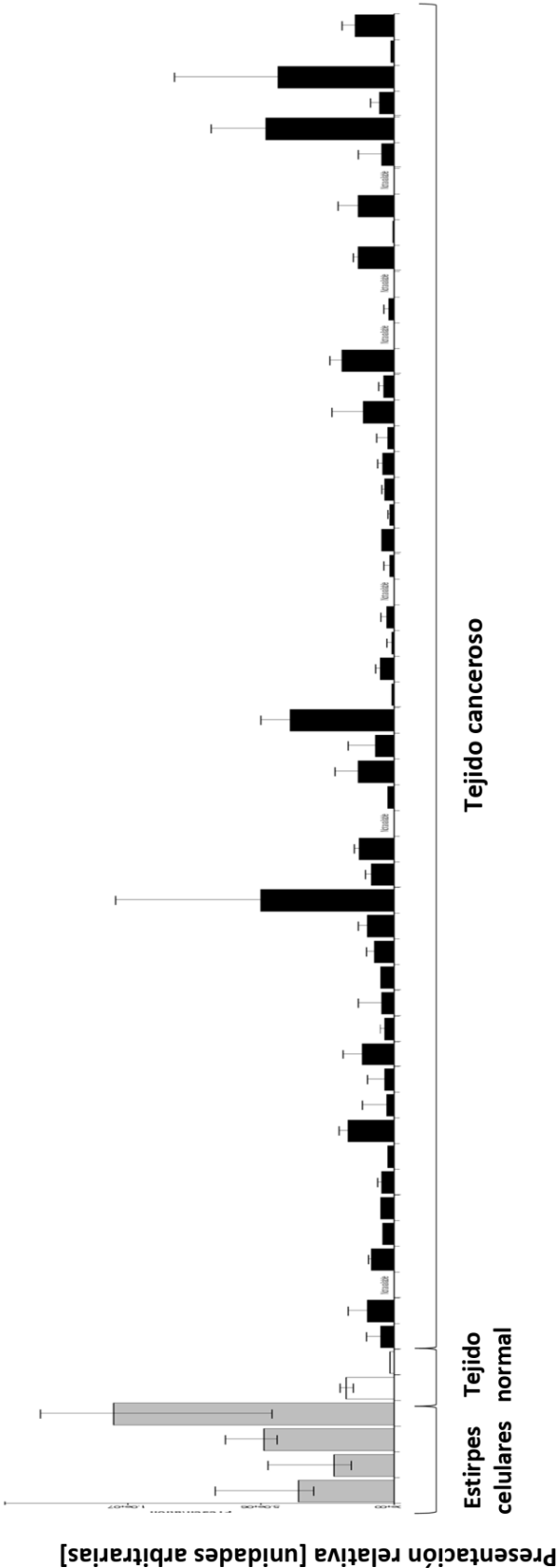
Figura 1D - Péptido: RLHDENILL (A*02:01)



Péptido detectado en
1 estirpe de células de cáncer de riñón, 1 estirpe de células de cáncer de próstata, 1 estirpe de células de melanoma, 0 tejidos normales, 50 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 3 cánceres de riñón, 2 cánceres hepáticos, 23 cánceres de pulmón, 7 cánceres de ovario, 2 cánceres de páncreas, 2 cánceres de próstata, 3 cánceres de recto y 1 cáncer gástrico) (de izquierda a derecha)

Figura 1E

Péptido: SVLEKEIYSI (A*02:01)
SEQ ID: 2



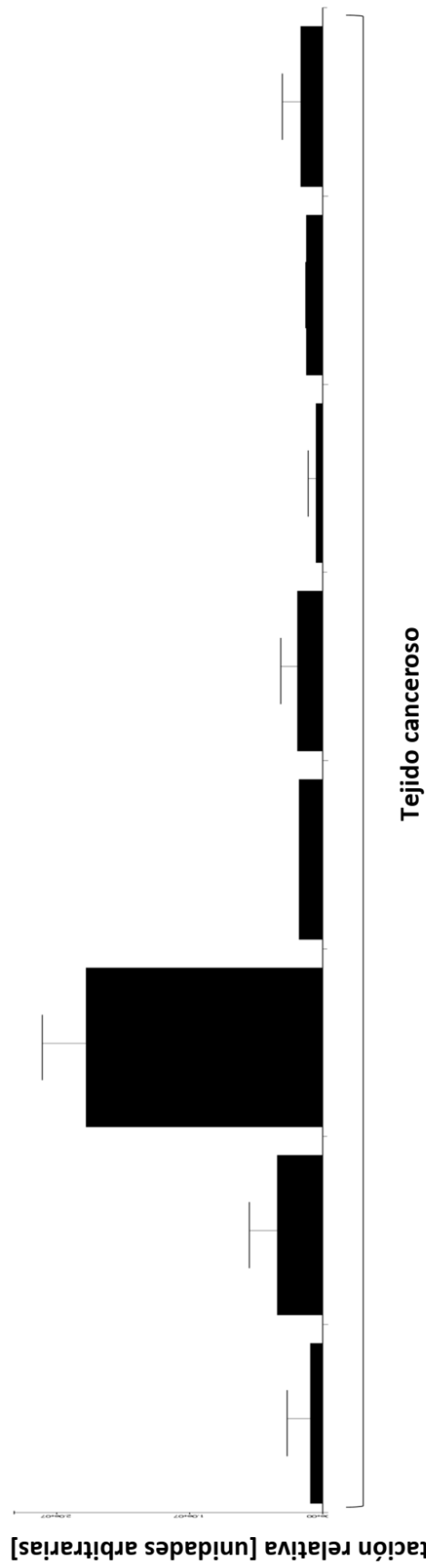
Péptido detectado en

4 estirpes celulares (3 sanguíneas y 1 de páncreas), 2 tejidos normales (1 ganglio linfático y 1 tráquea), 52 tejidos cancerosos (2 cánceres de vías biliares, 1 cáncer de células mieloides, 3 leucemias leucocíticas, 5 cánceres de mama, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de vesícula biliar, 4 cánceres de colon, 7 cánceres de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 7 cánceres de ovario, 4 cánceres de próstata, 2 cánceres de piel, 2 cánceres de vejiga urinaria, 2 cánceres de útero y 4 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1F

Péptido: KIWEELSVLEV (A*02:01)

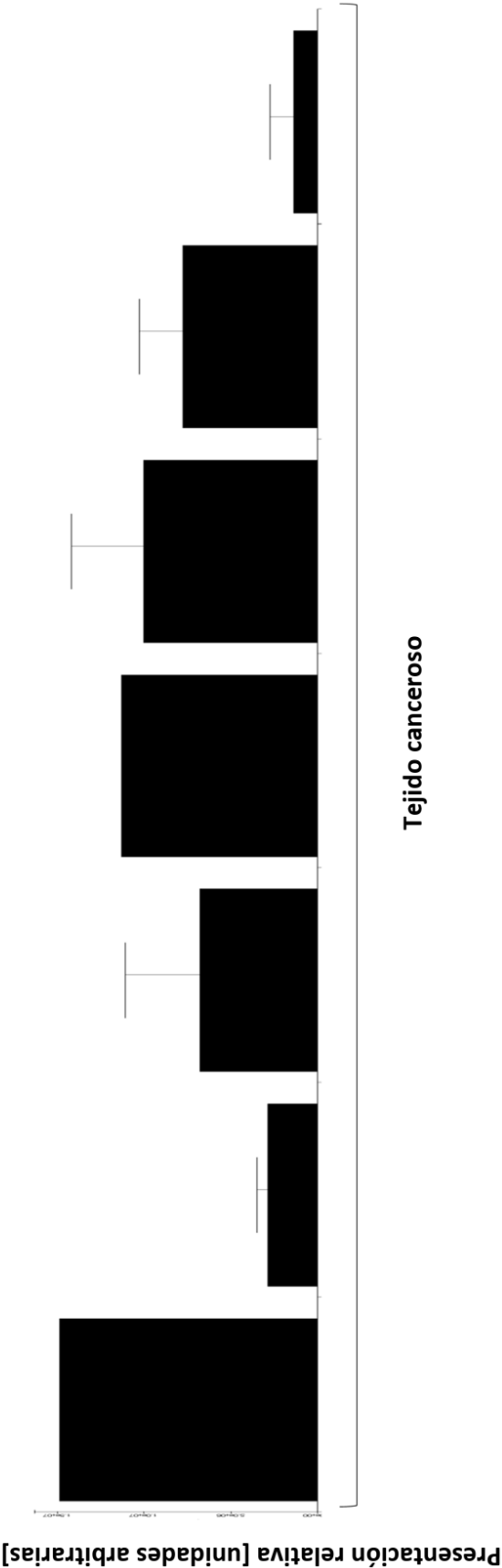
SEQ ID: 40



Péptido detectado en
8 tejidos cancerosos (1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago y 1 cáncer de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha)

Figura 1G

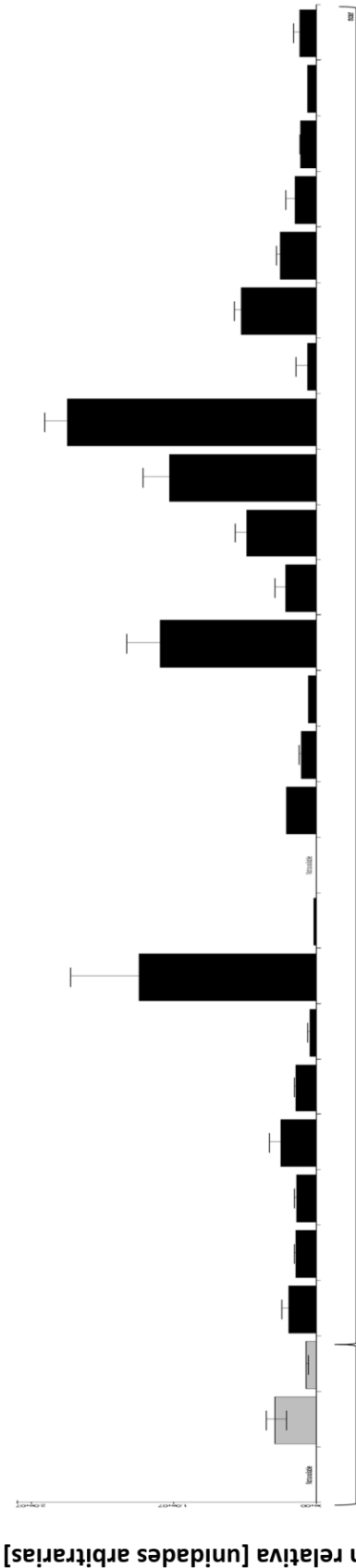
Péptido: FLIENLLAA (A*02:01)
SEQ ID: 67



Péptido detectado en
7 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 2 cánceres de pulmón y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1H

Péptido: FLLEREQLL (A*02:01)
SEQ ID: 84

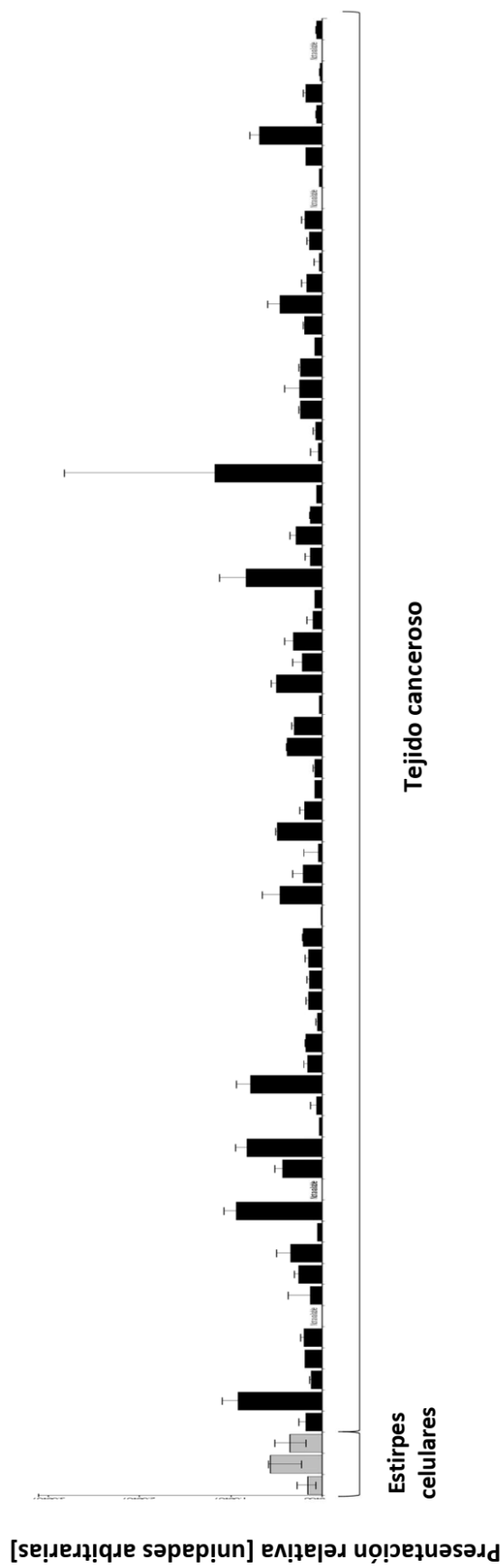


Péptido detectado en
3 estirpes celulares (2 de células sanguíneas y 1 de piel), 24 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloideas, 3 leucemias leucocíticas, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de colon, 3 cánceres de recto, 1 cáncer de pulmón, 7 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1J

Péptido: GLAEFQENV (A*02:01)

SEQ ID: 243



Péptido detectado en

3 estirpes celulares (1 de células sanguíneas, 1 de riñón y 1 de páncreas), 67 tejidos cancerosos (1 cáncer de vías biliares, 4 leucemias leucocíticas, 1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de cerebro, 3 cánceres de mama, 4 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 2 cánceres de colon, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de hígado, 15 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 9 cánceres de ovario, 3 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria y 6 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 2H

Gen(es): IGF2BP1, IGF2BP3
Péptido: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274

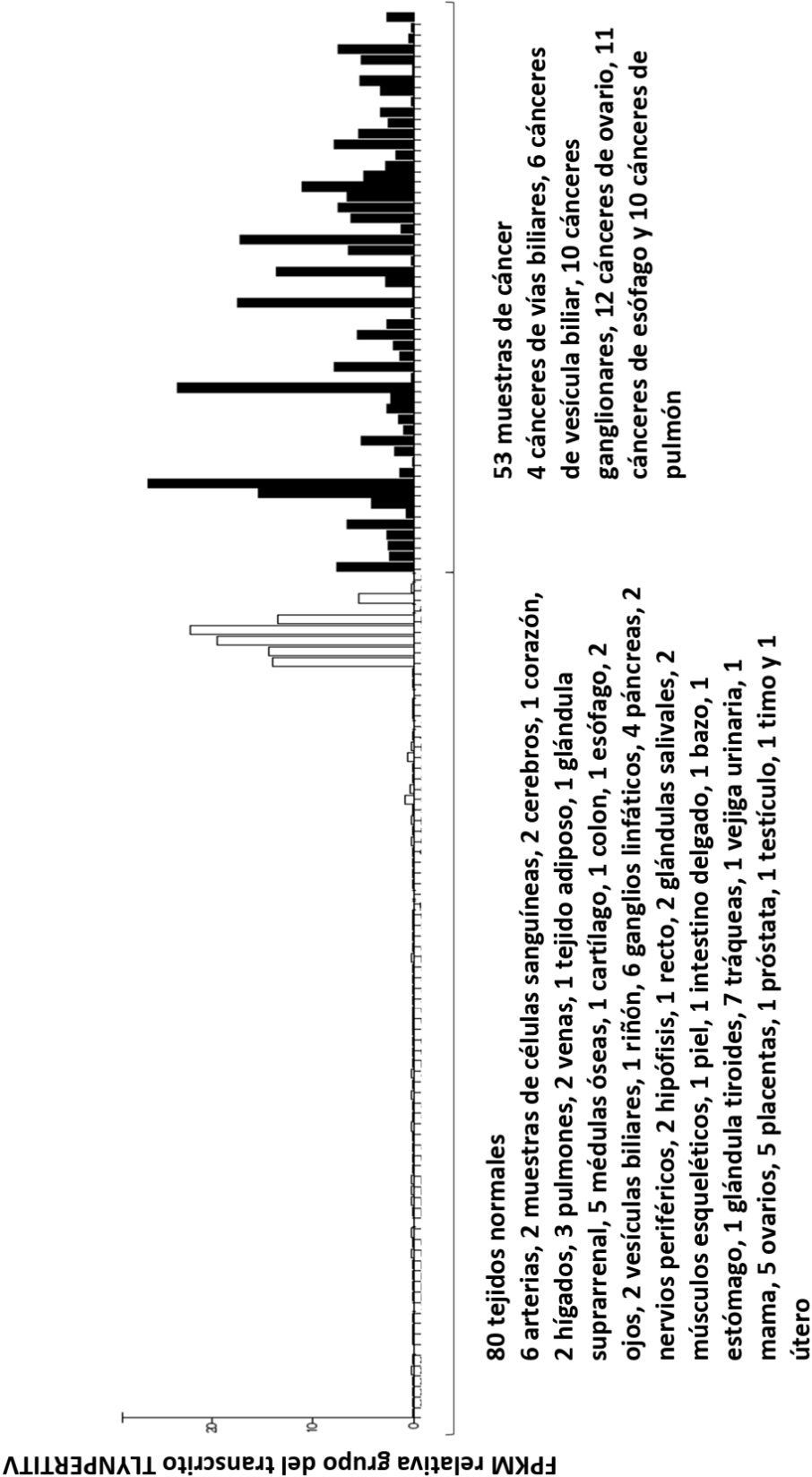
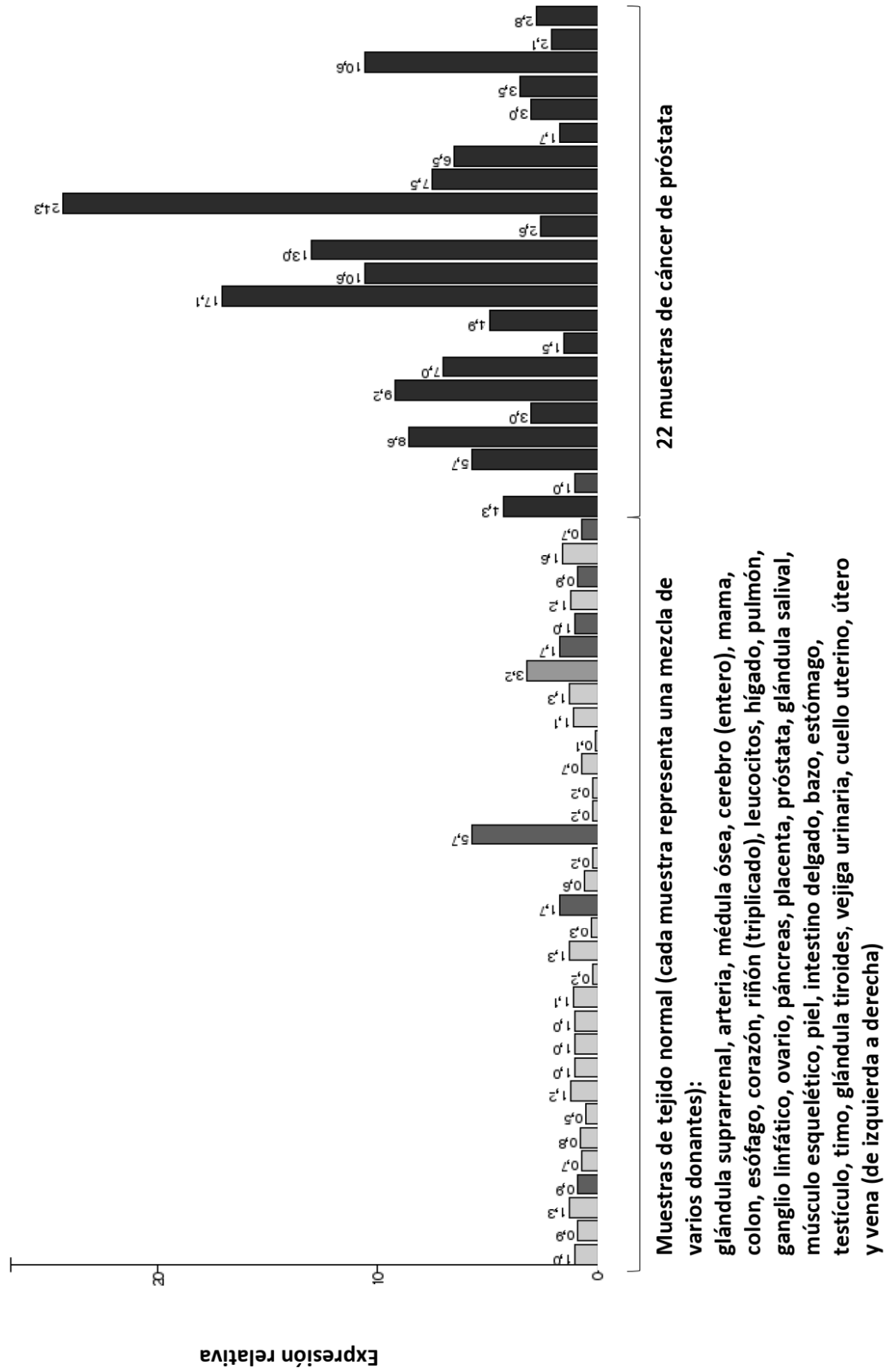


Figura 2A - Gen: PRIM2



Expresión relativa

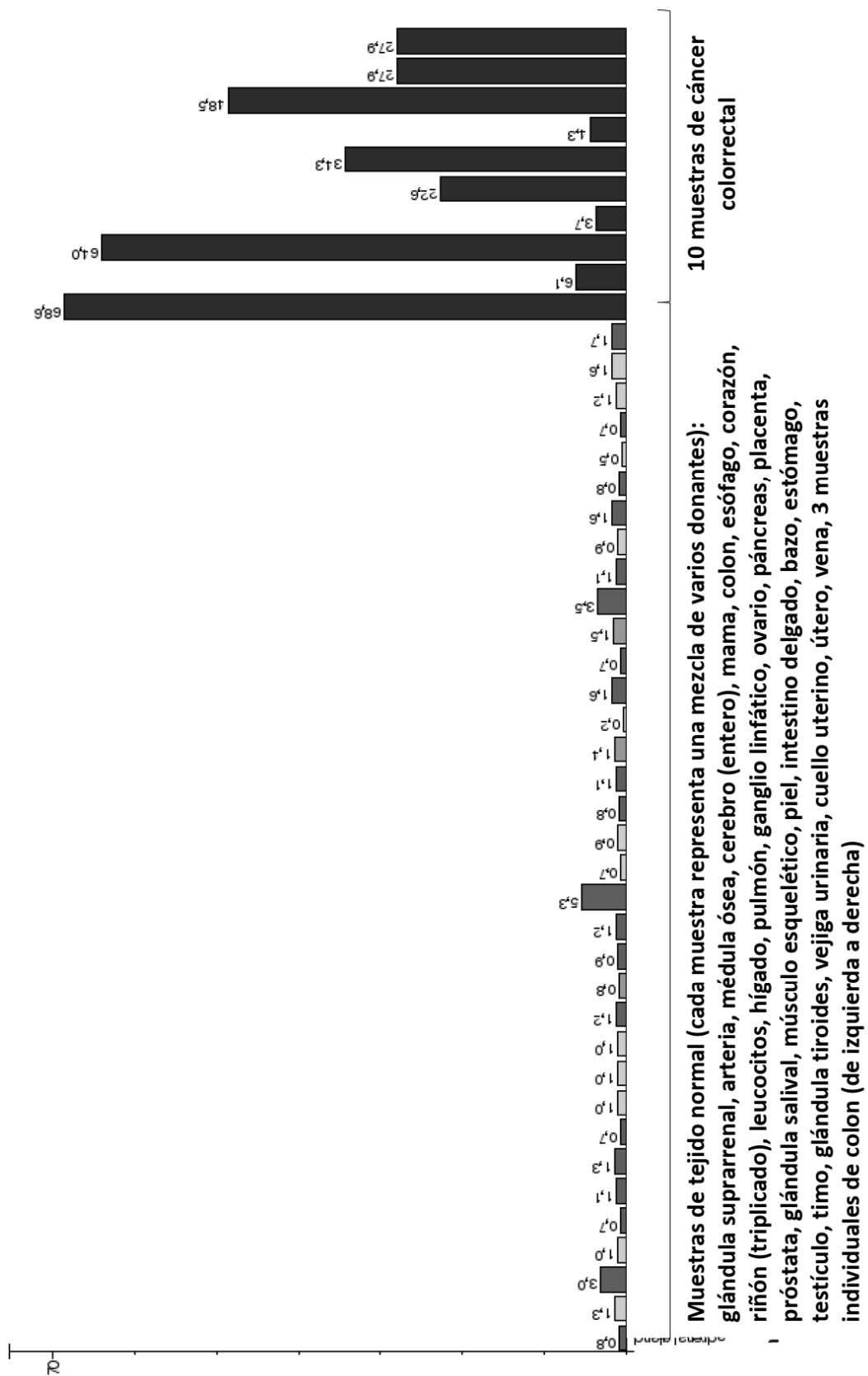


Figura 2C - Gen: TTC30A

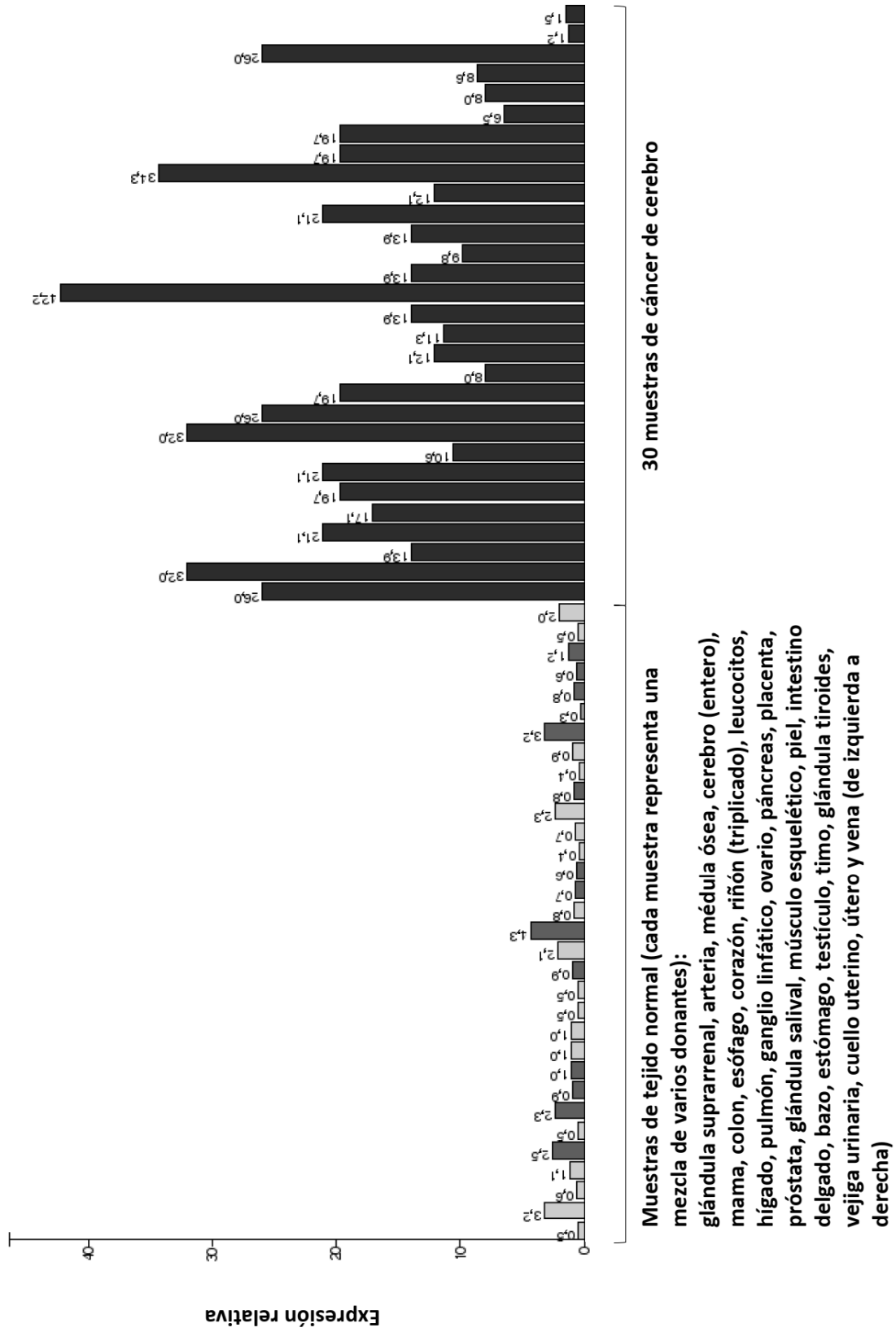
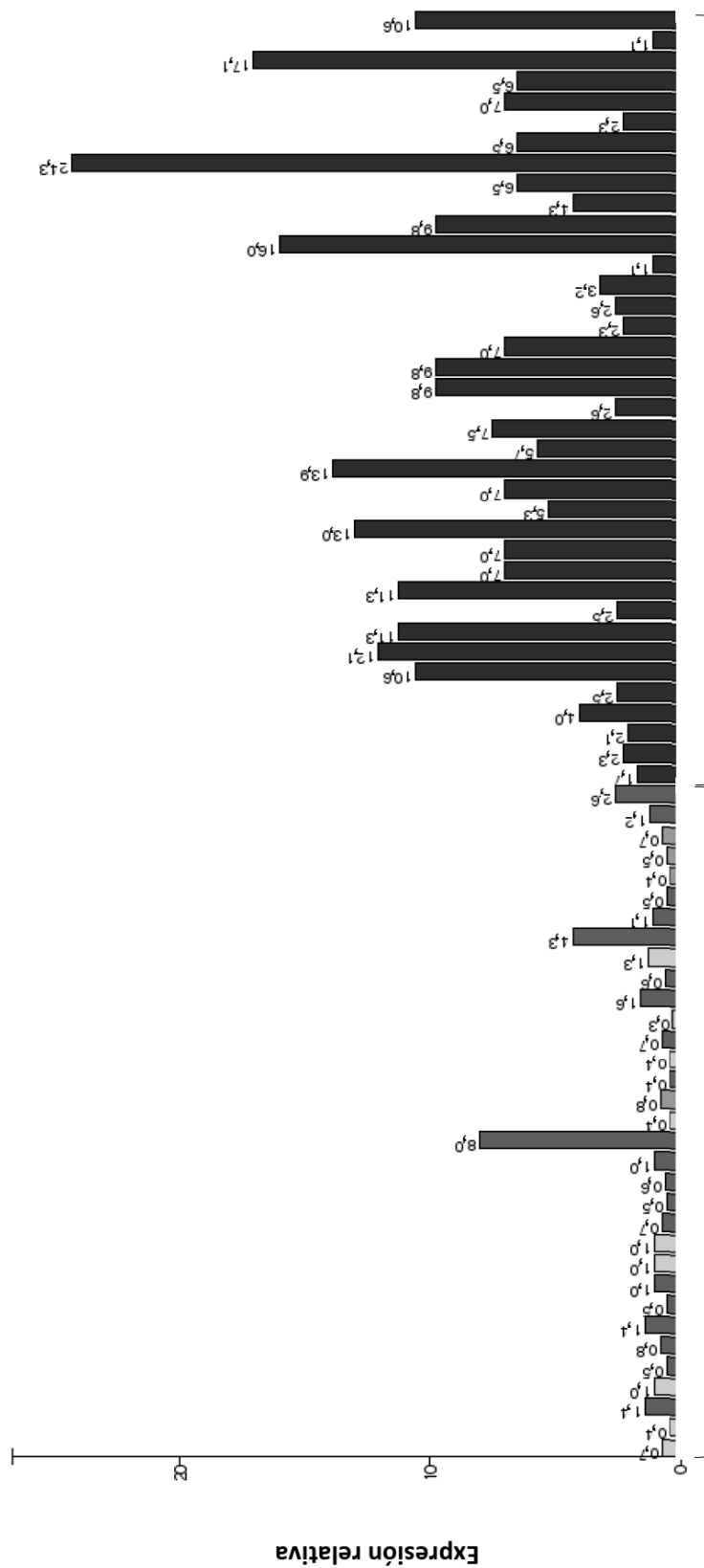


Figura 2D - Gen: TRIP13



Muestras de tejido normal (cada muestra representa una mezcla de varios donantes):
 glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena, 1 muestra individual de pulmón (de izquierda a derecha)

Figura 2E - Gen: MXRA5

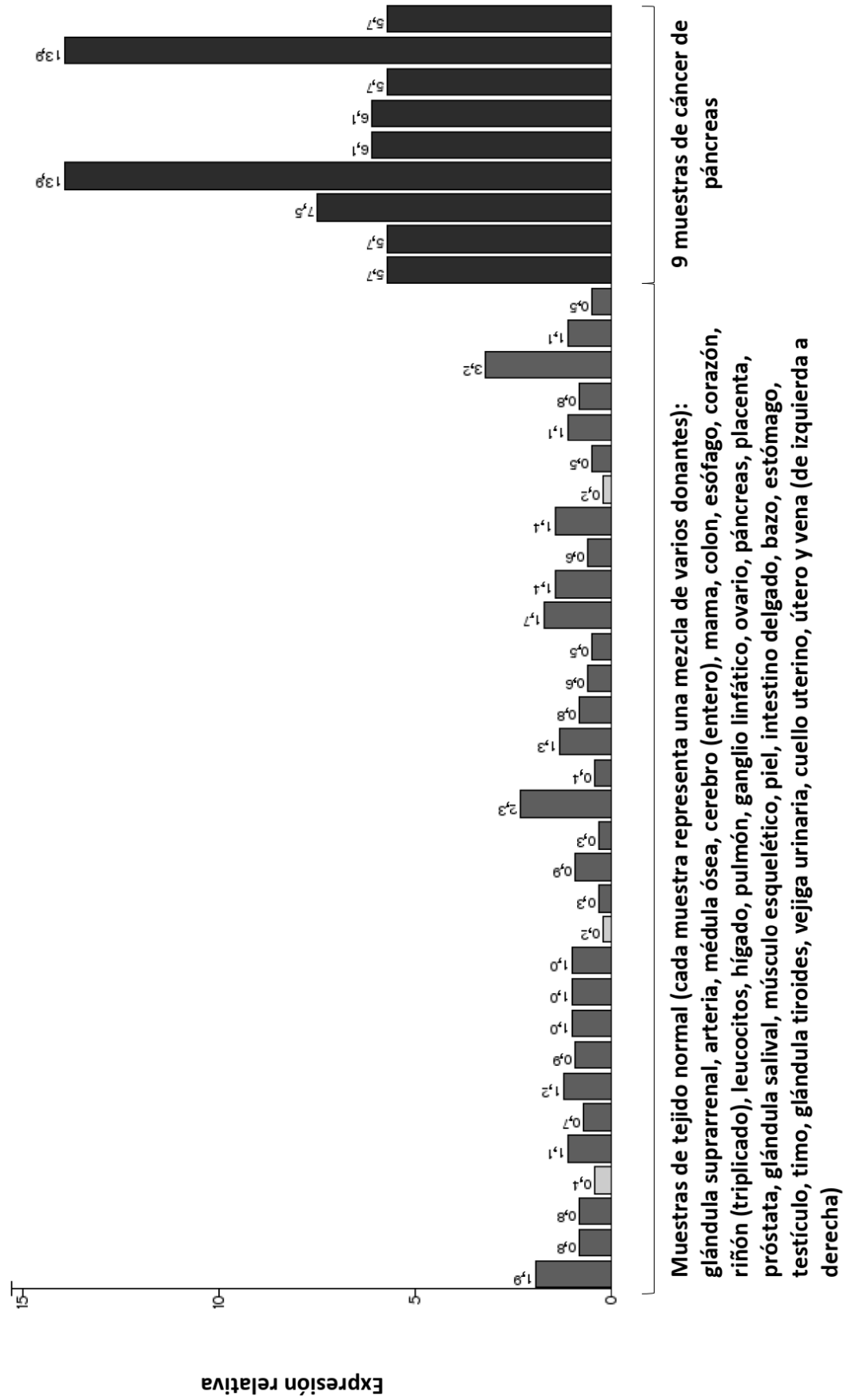


Figura 2F

Gen(es): MMP11, MMP13
Péptido: KVSQDVTPL
SEQ ID: 24

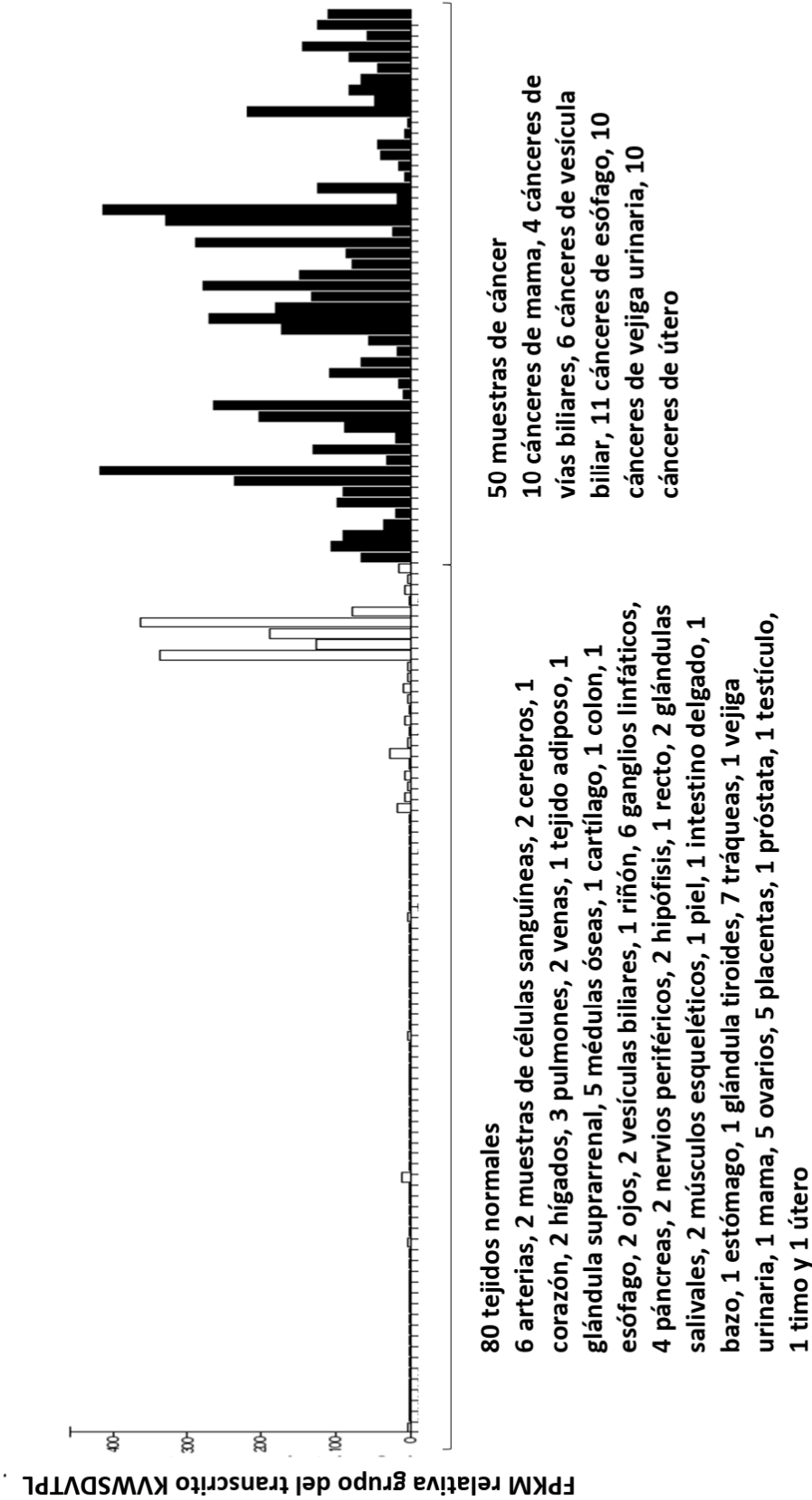


Figura 2G

Gen: HORMAD1
Péptido: VIFEGEPMYL
SEQ ID: 168

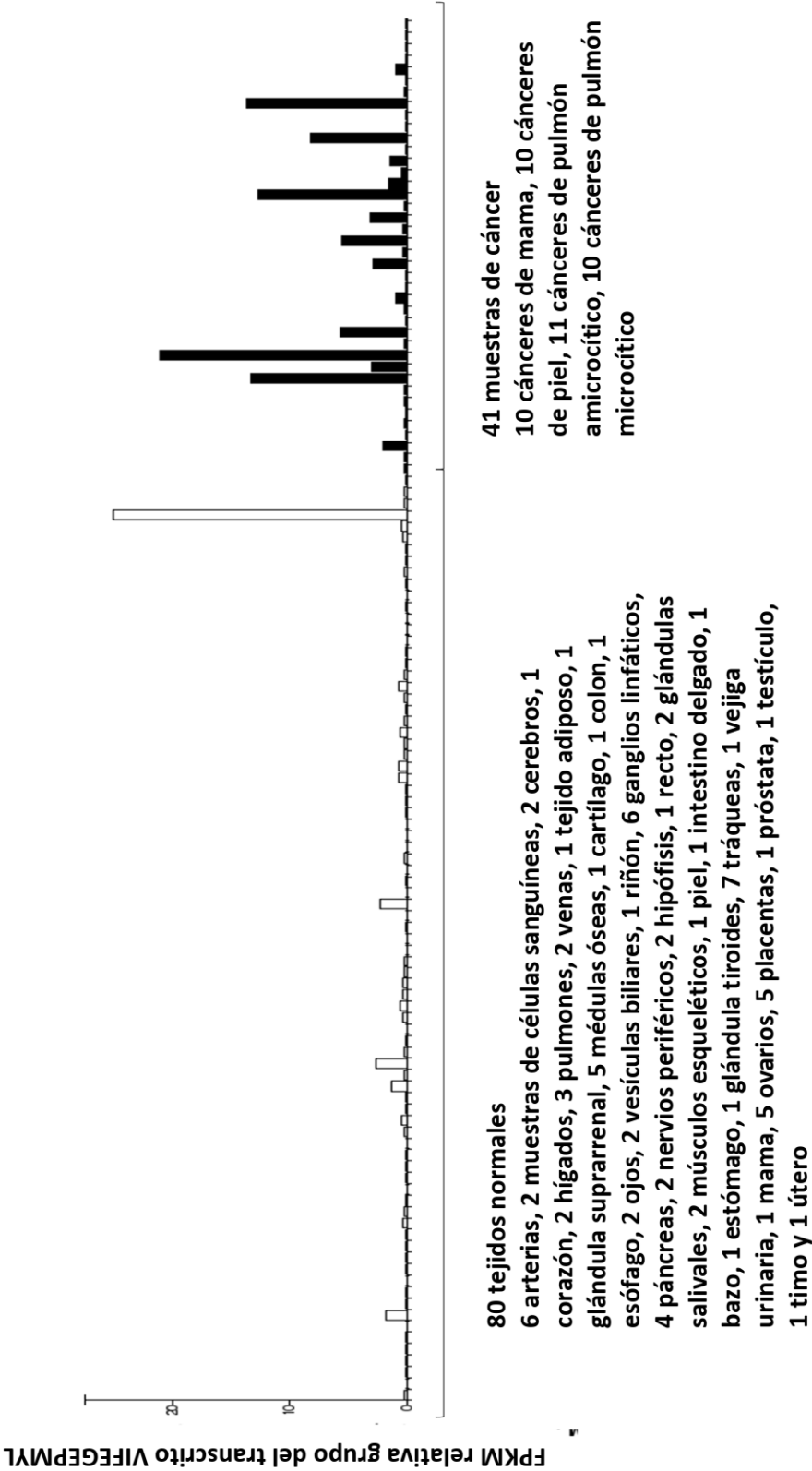


Figura 2H

Gen(es): IGF2BP1, IGF2BP3
Péptido: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274

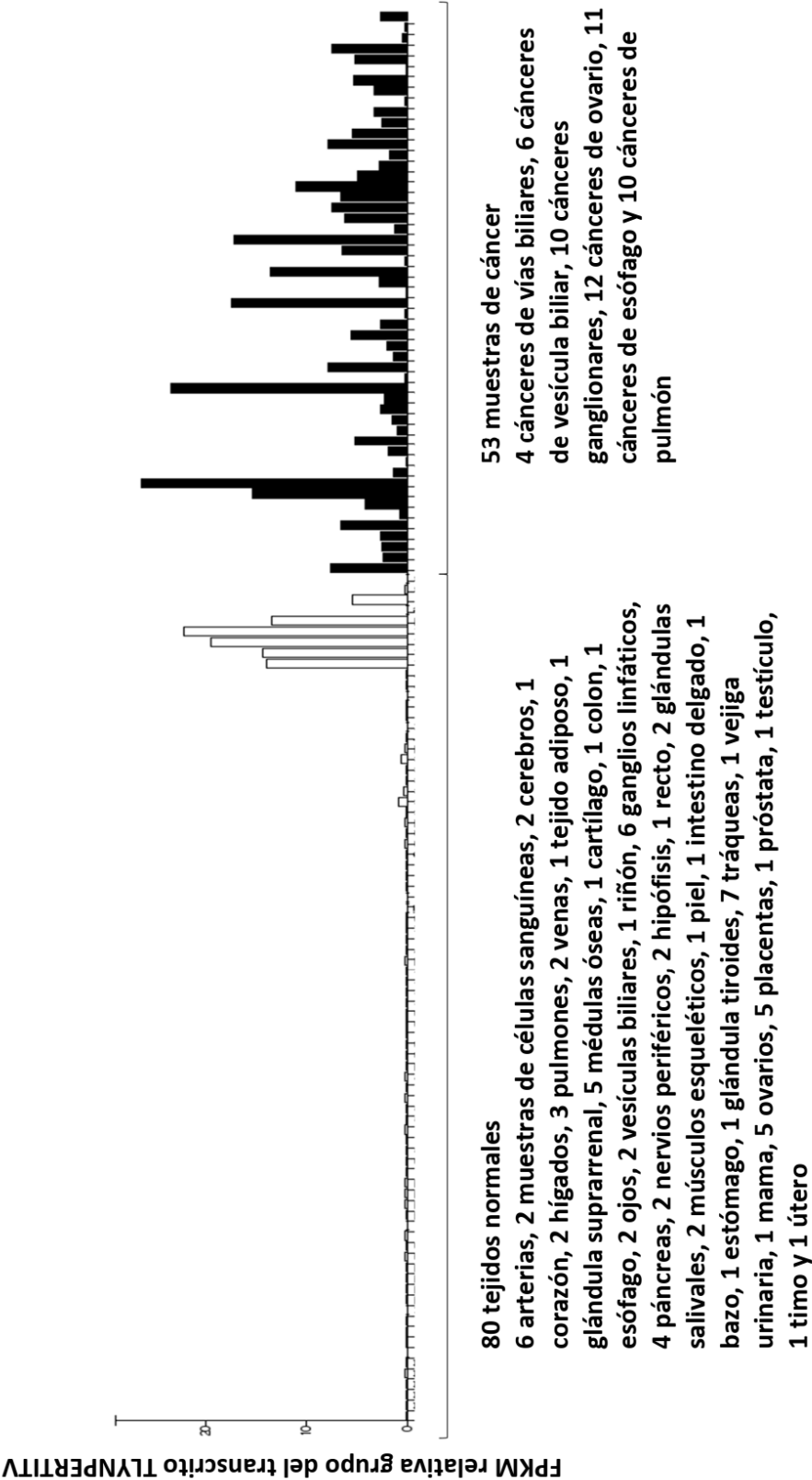


Figura 3

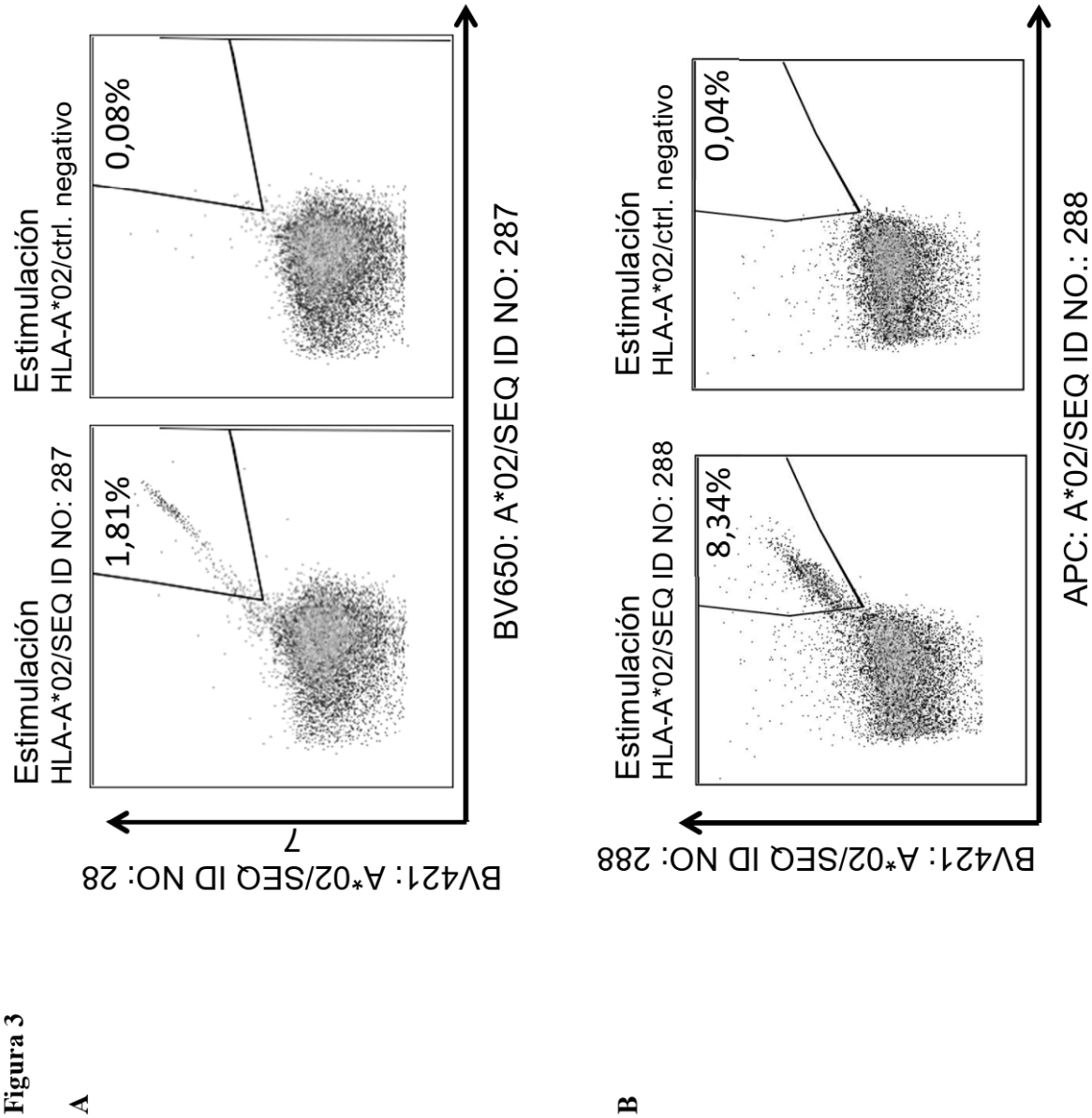
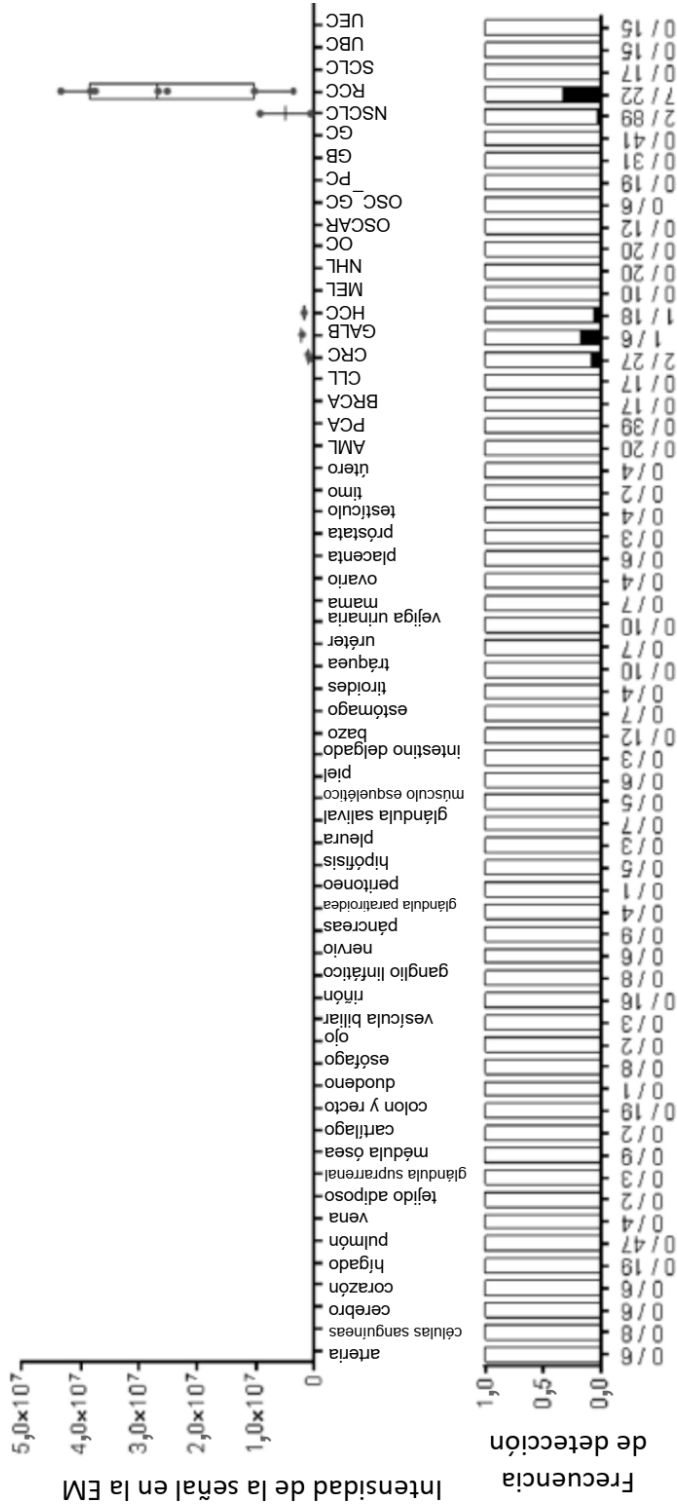
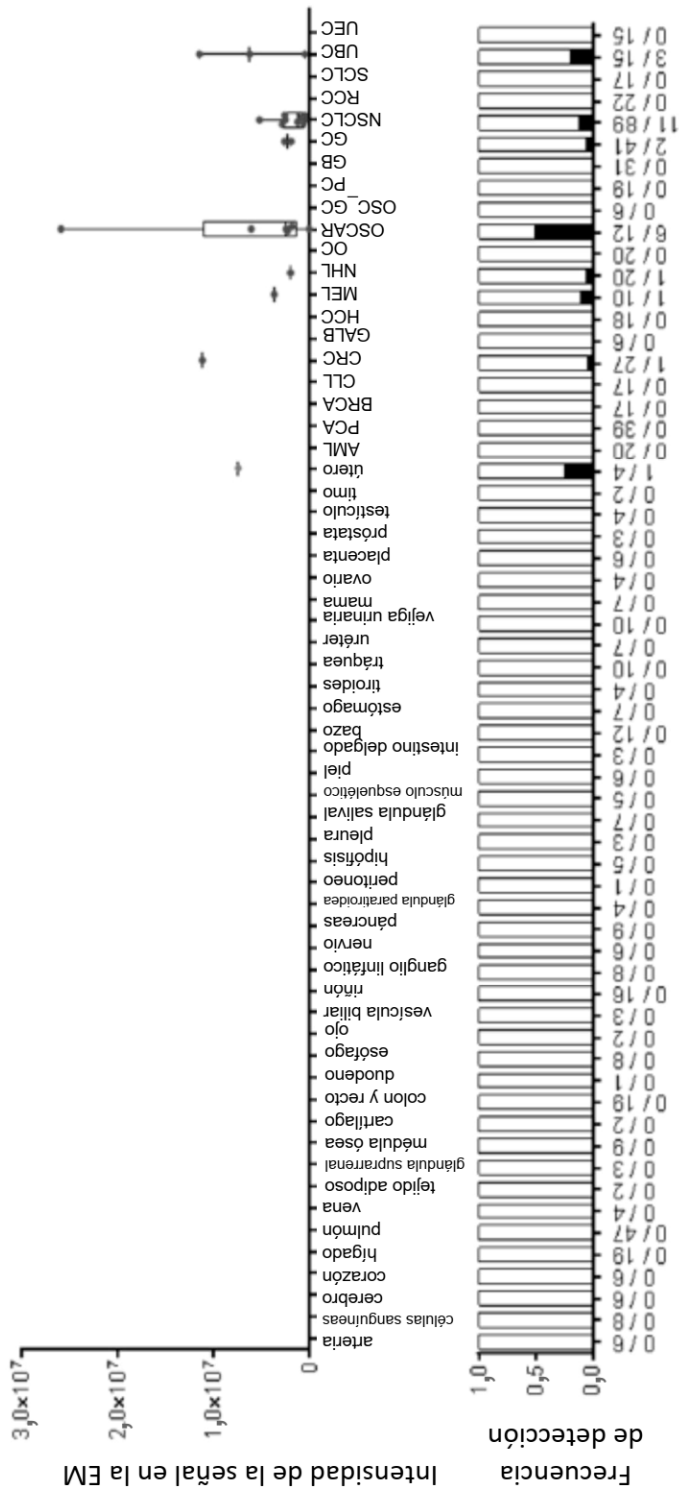


Figura 4A
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



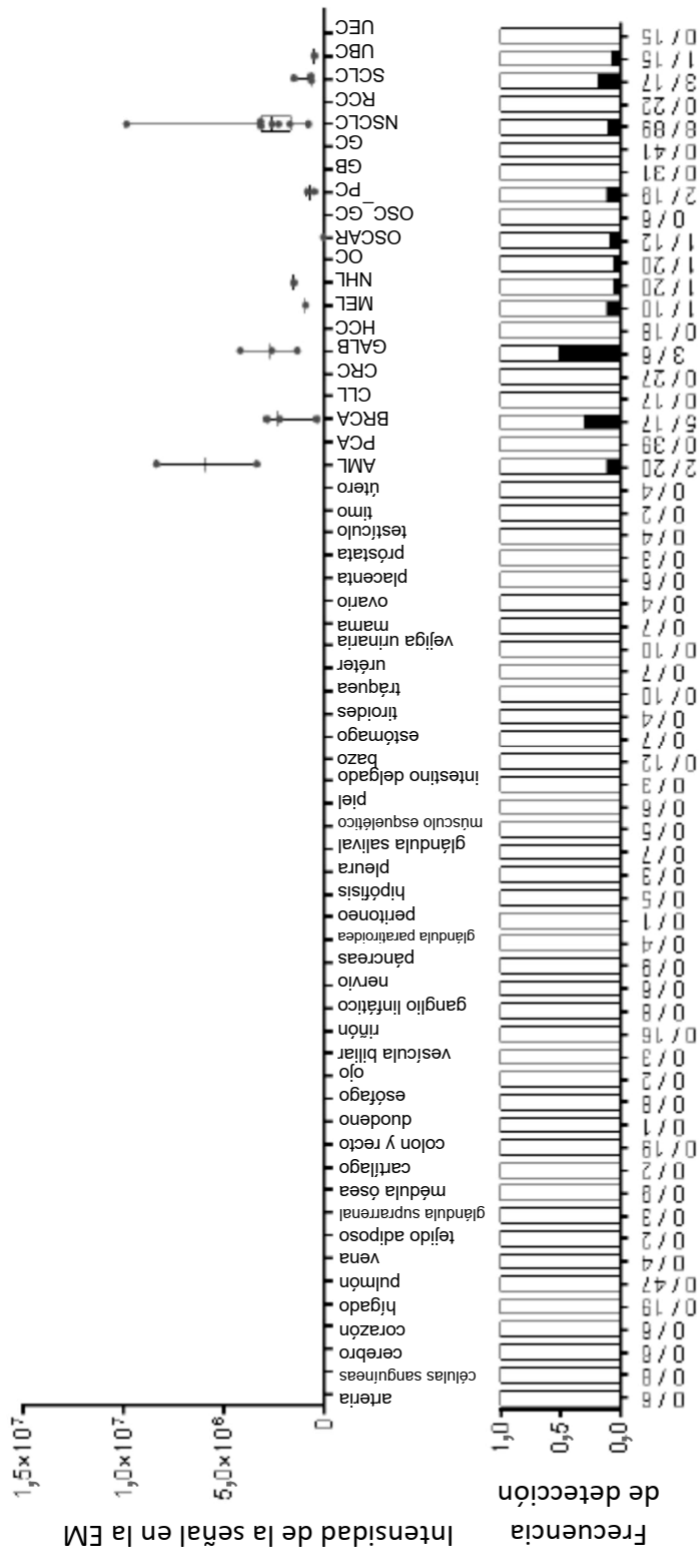
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4B
SEQ ID NO: 14: MMP1-003



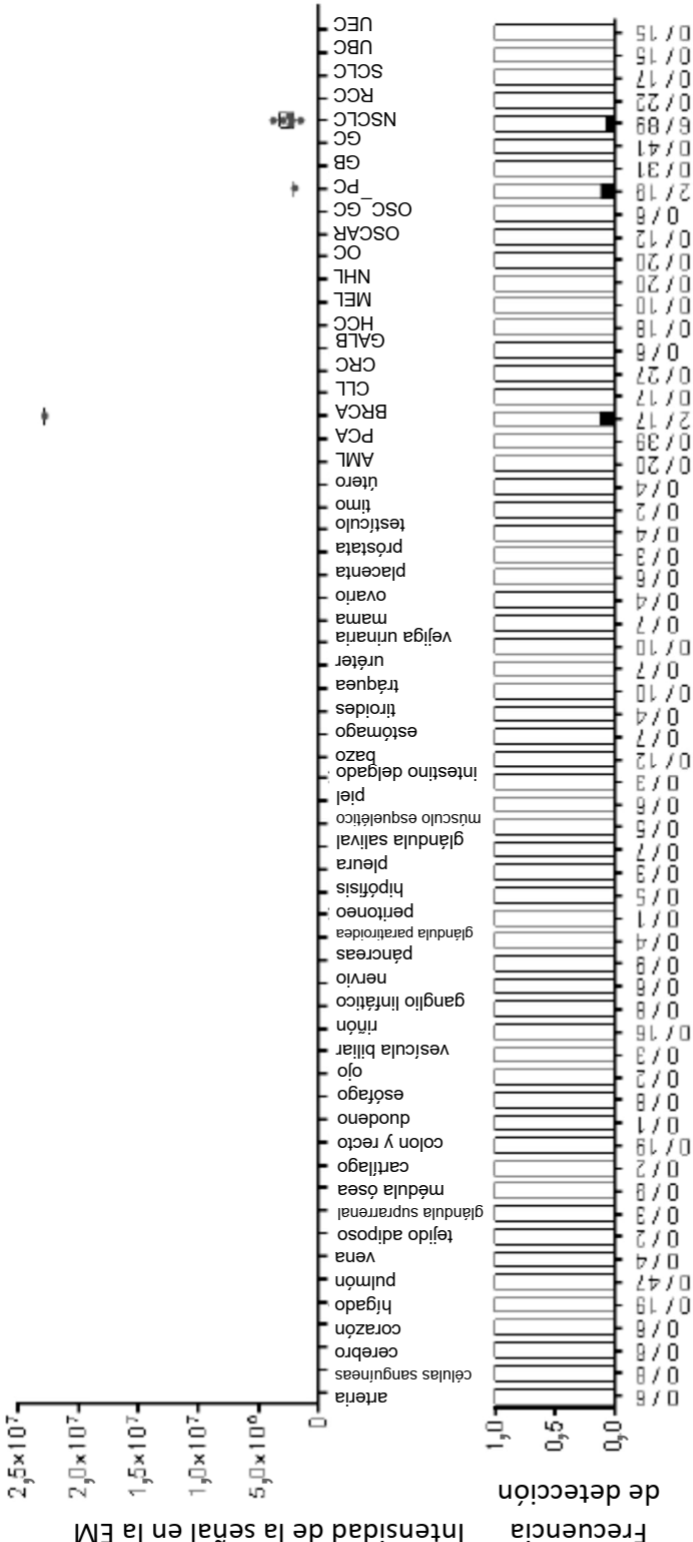
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4C
SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



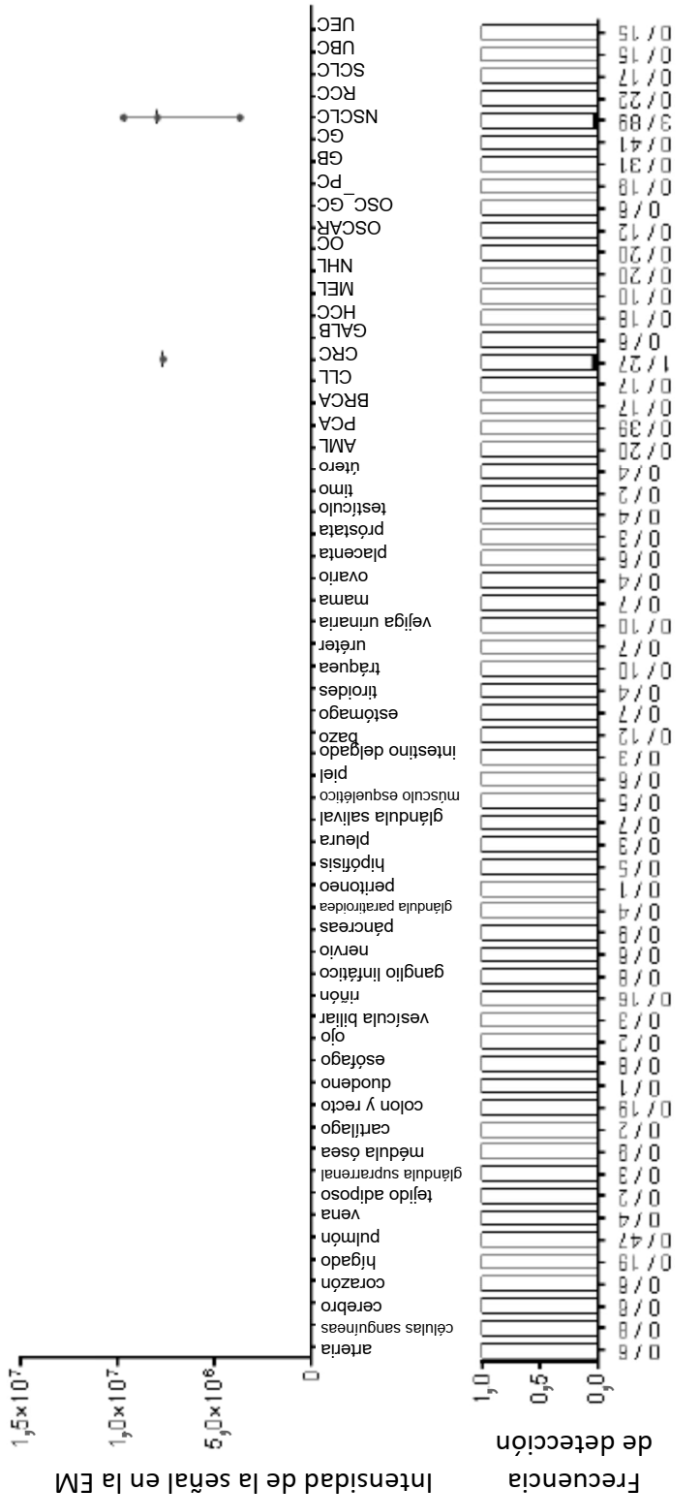
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4D
SEQ ID NO: 24: MMP-002



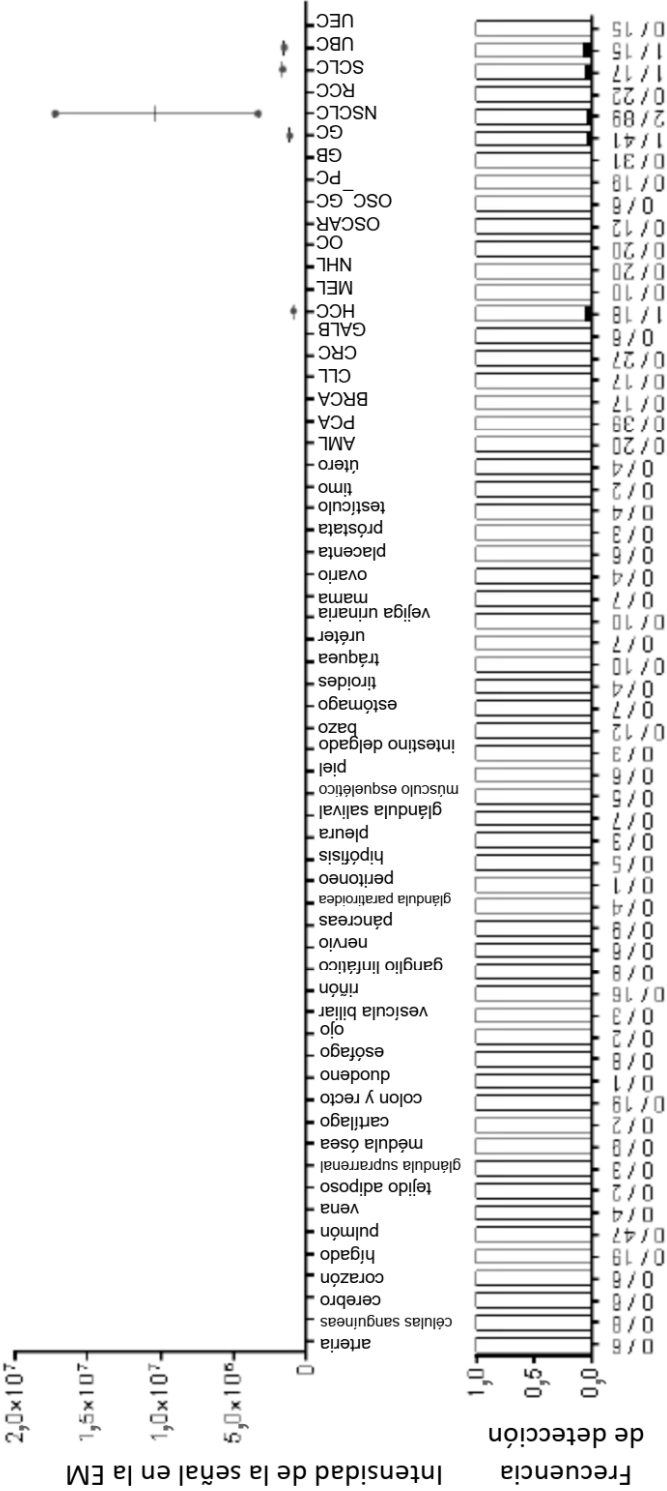
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon recto: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4E
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



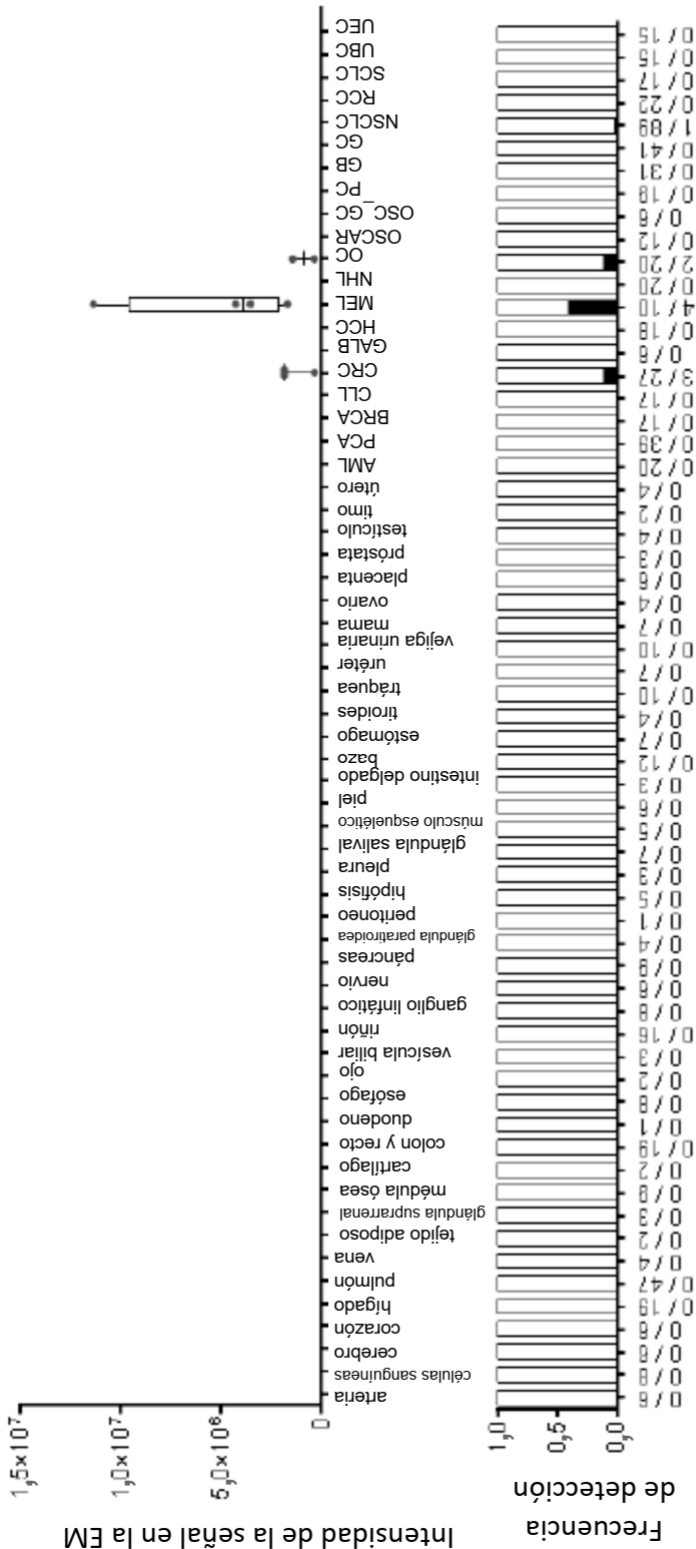
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4F
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



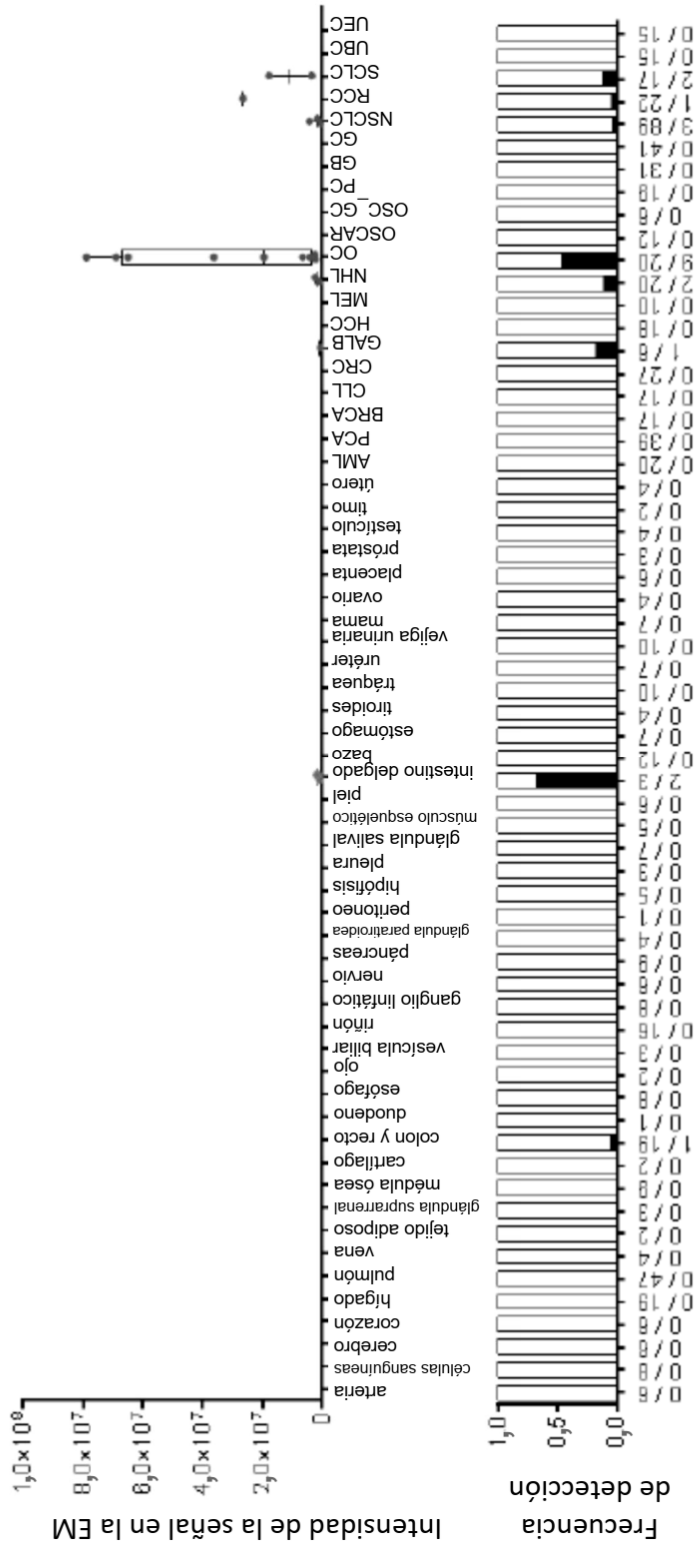
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon: y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4G
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



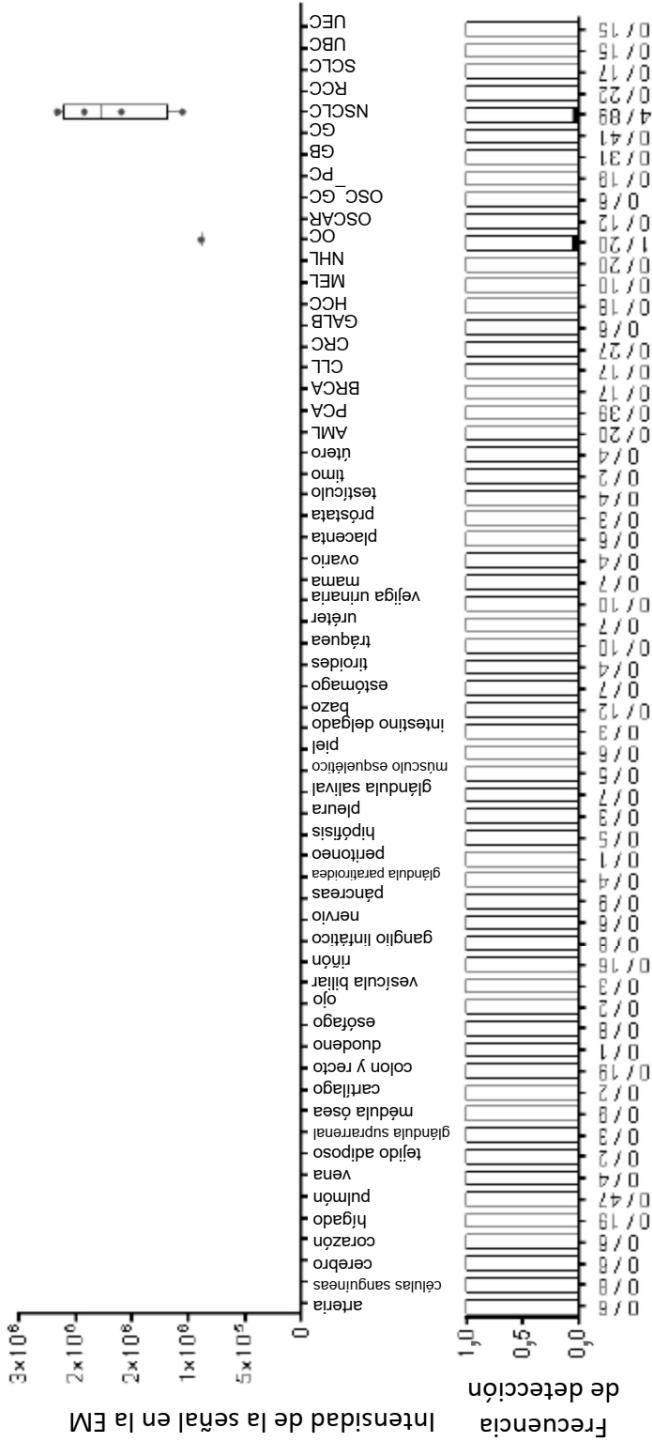
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; mús.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; tímo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4H
SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



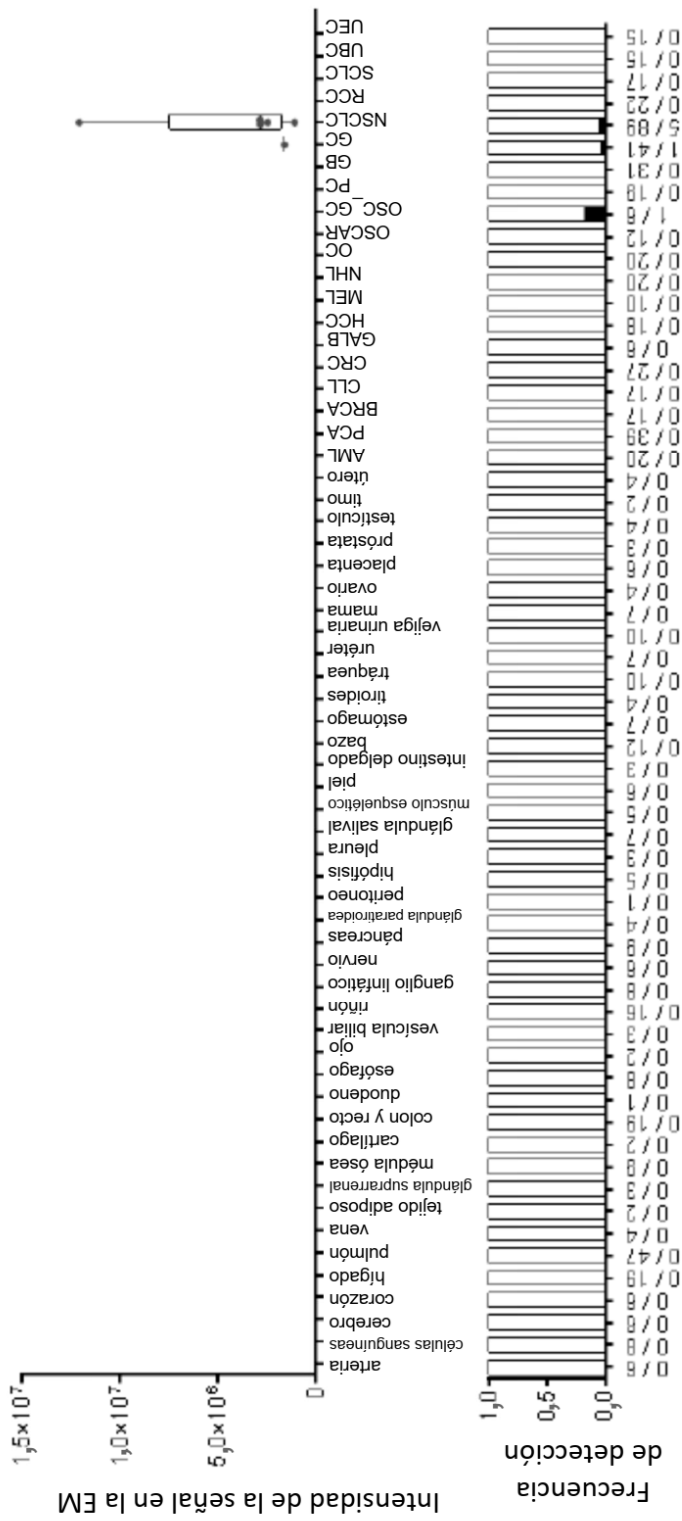
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; mús.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4I
SEQ ID NO: 117: CABY-001



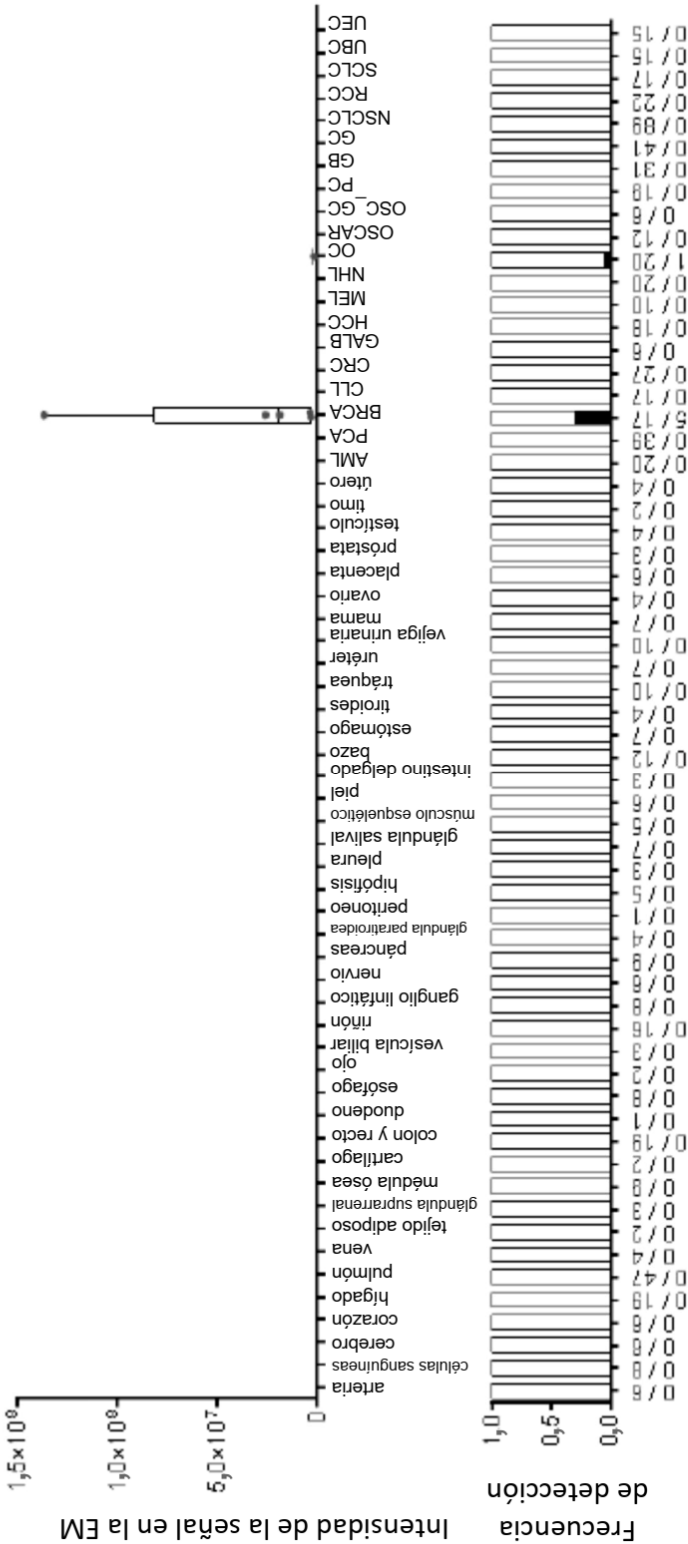
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4J
SEQ ID NO: 153: CT83-001



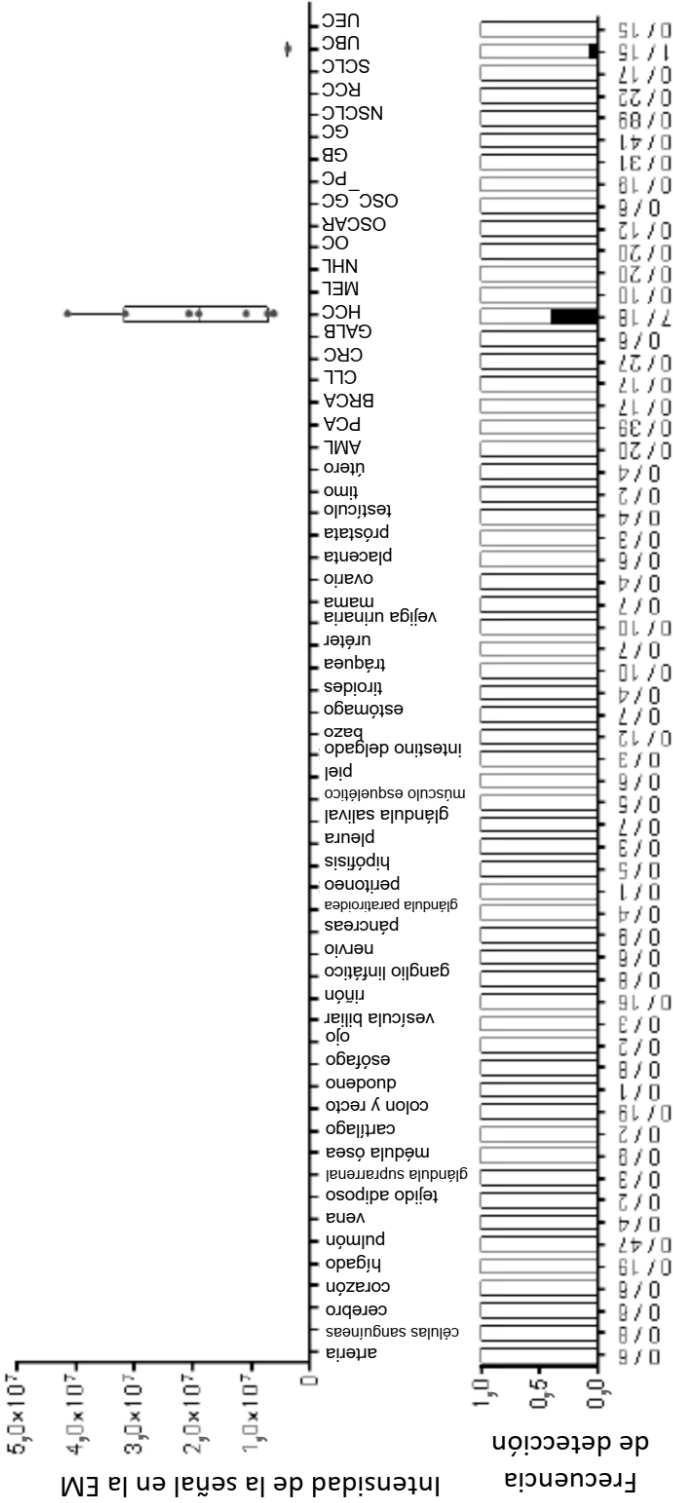
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; tímo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_gc; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4K
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; úter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4L
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4M
SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001

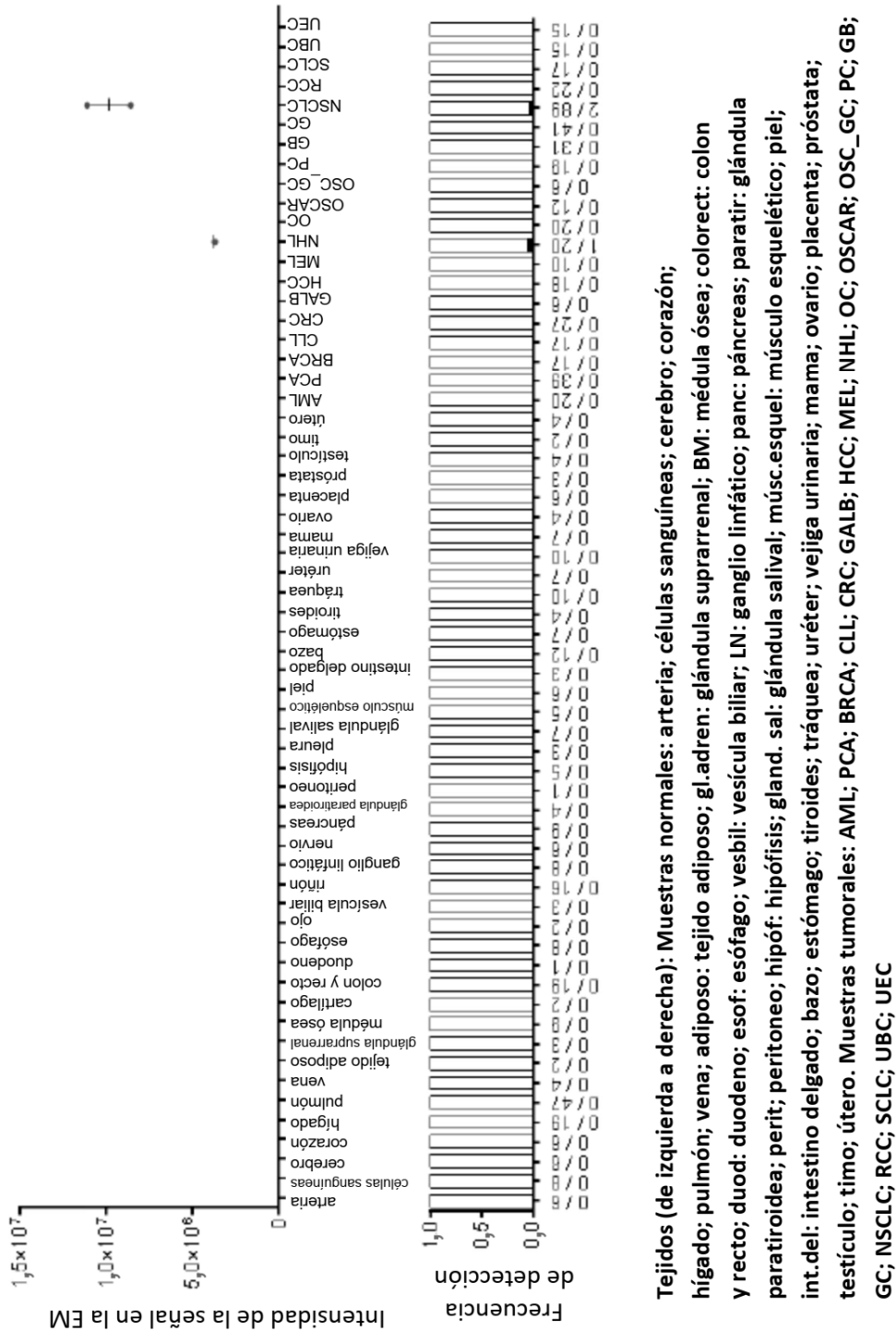
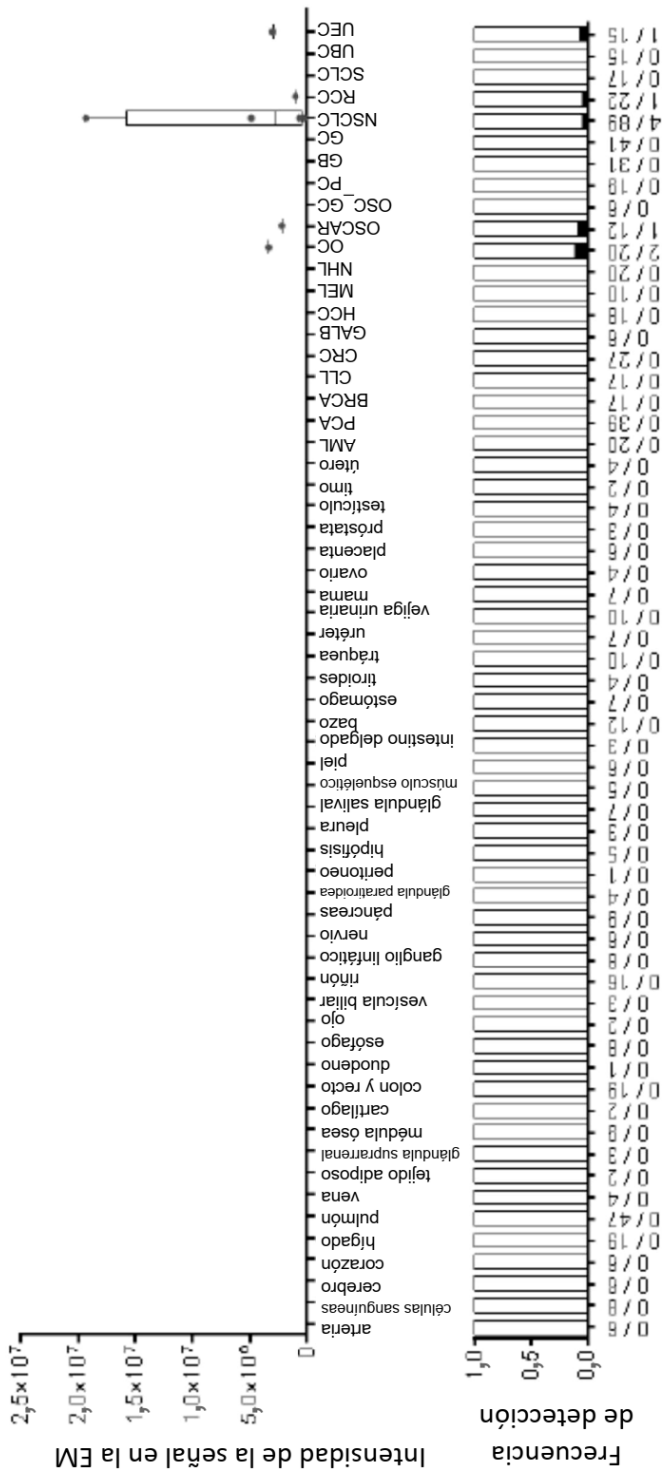
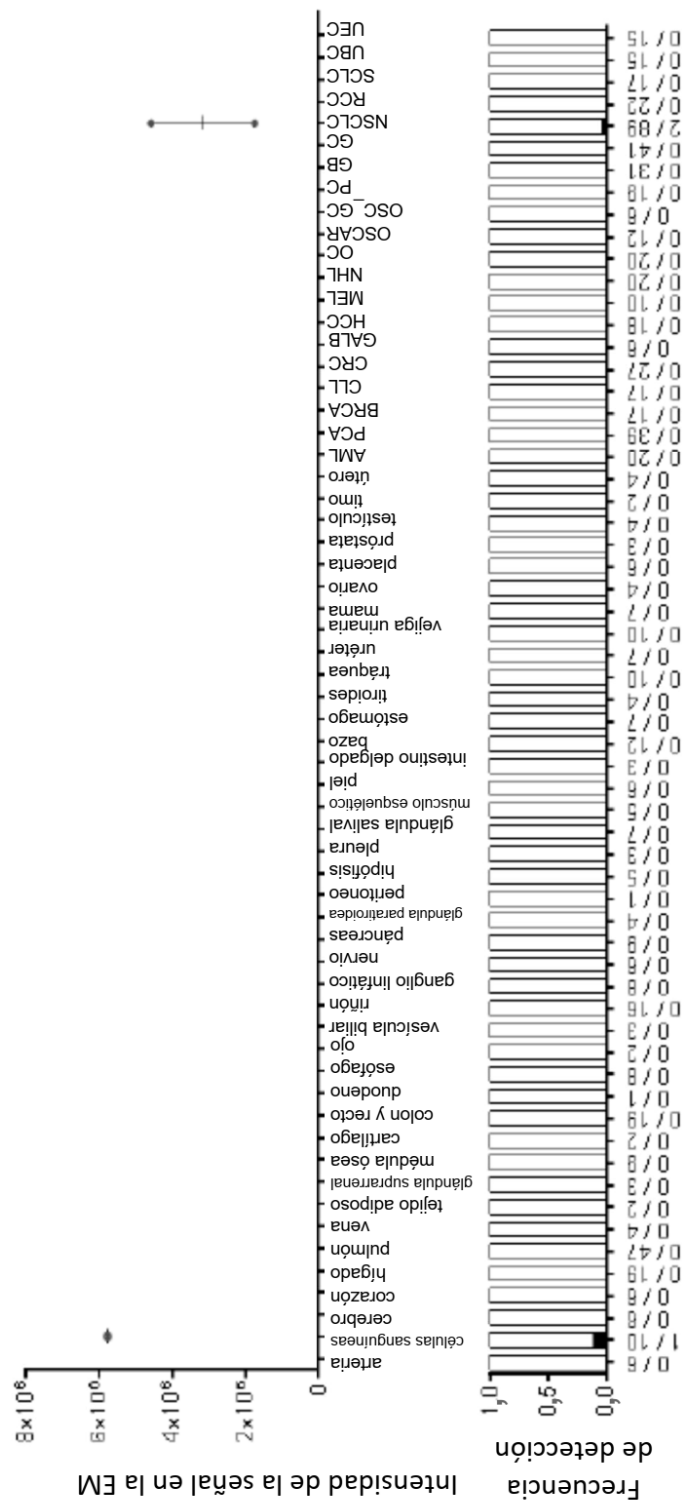


Figura 4N
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



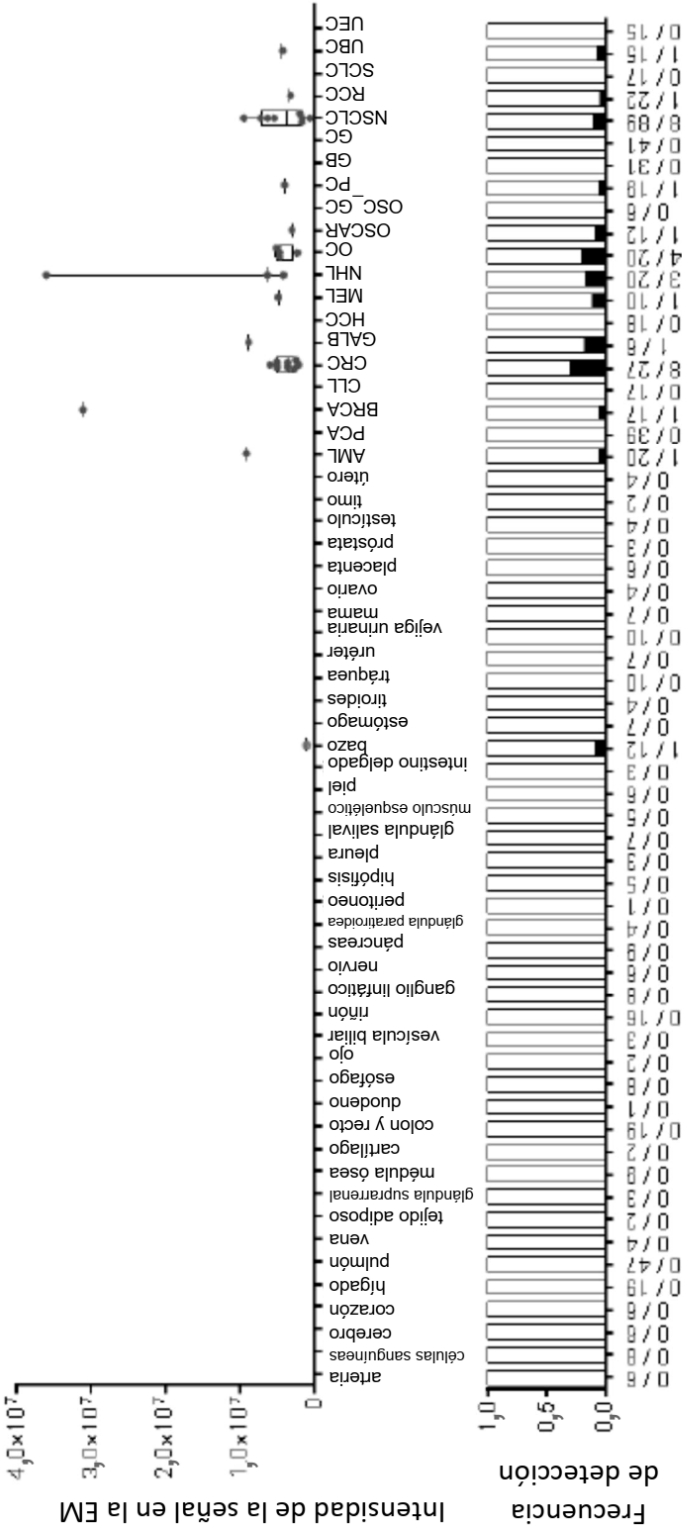
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; útero. Muestras tumorales: AML; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 40
SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



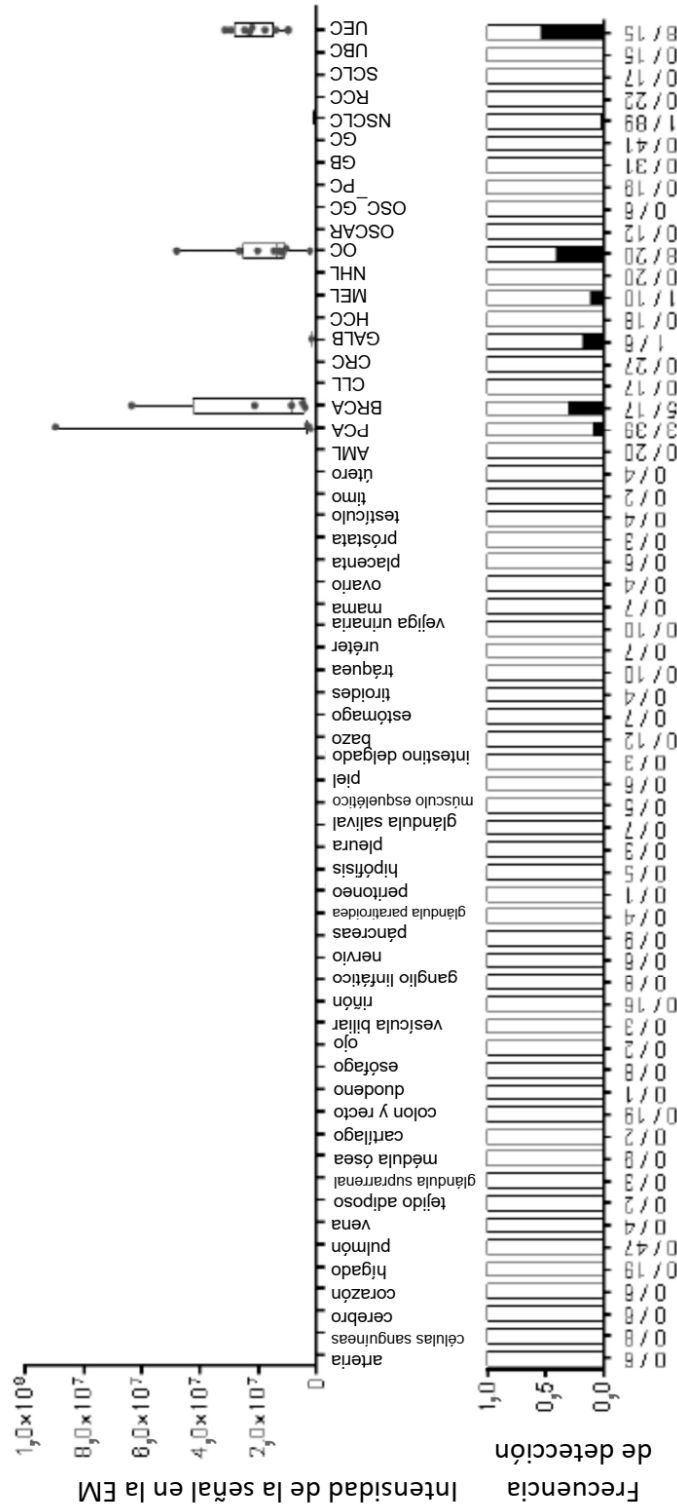
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4P
SEQ ID NO: 253: RAD54B-002



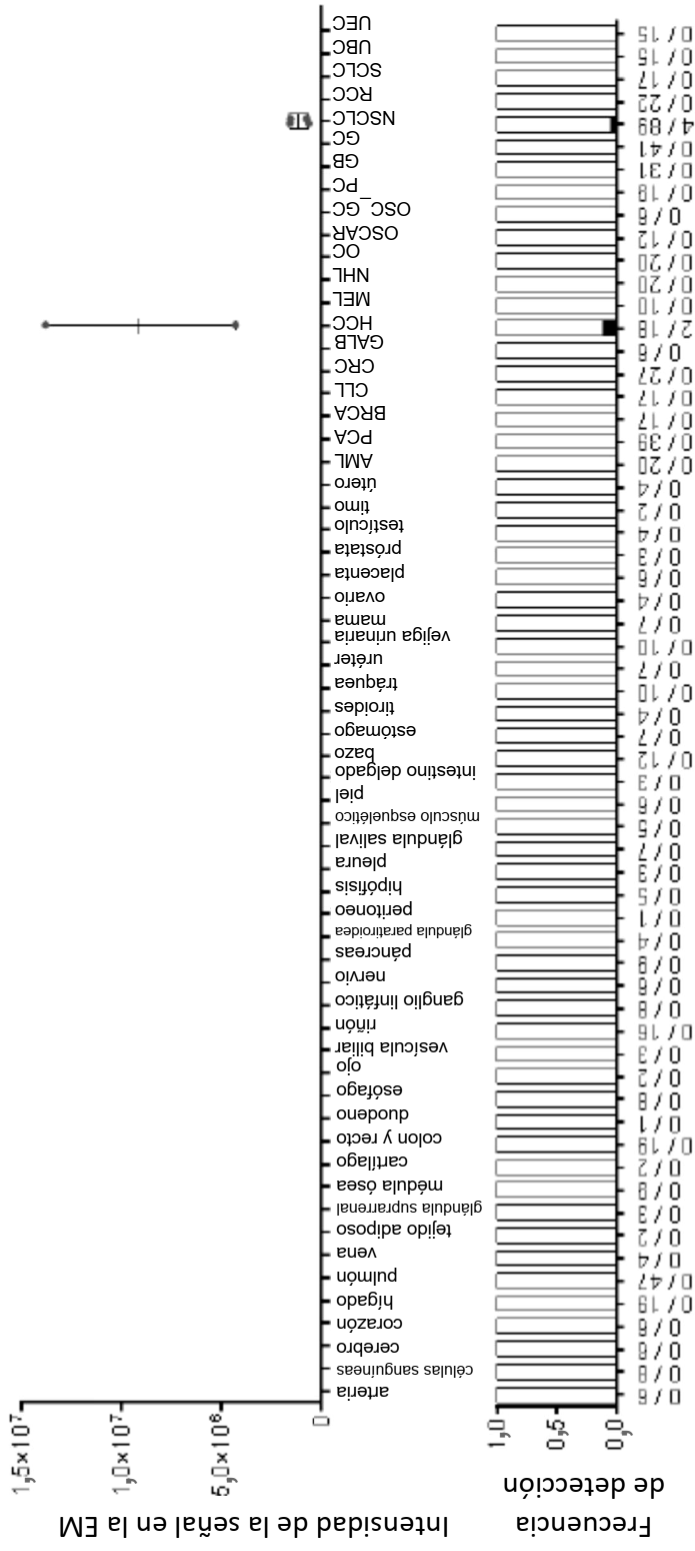
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; múscl.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4Q
SEQ ID NO: 264: ESR1-001



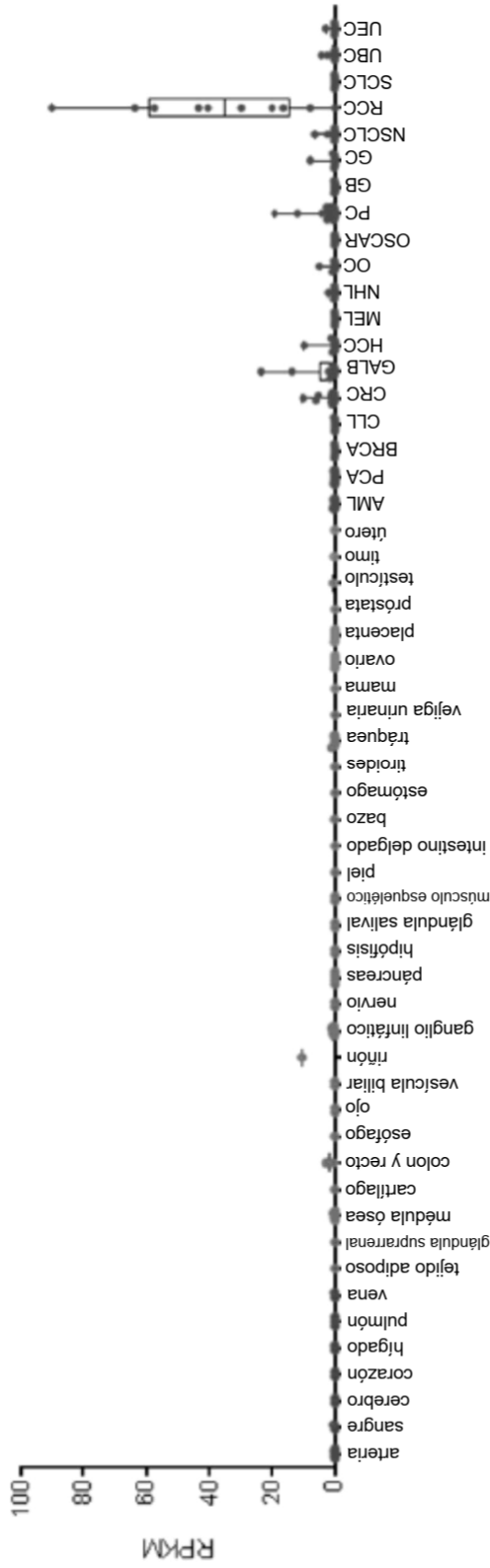
Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4R
SEQ ID NO: 274: IGF-004



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esof: esófago; vesbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; mús.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; úter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; tímo; útero. Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

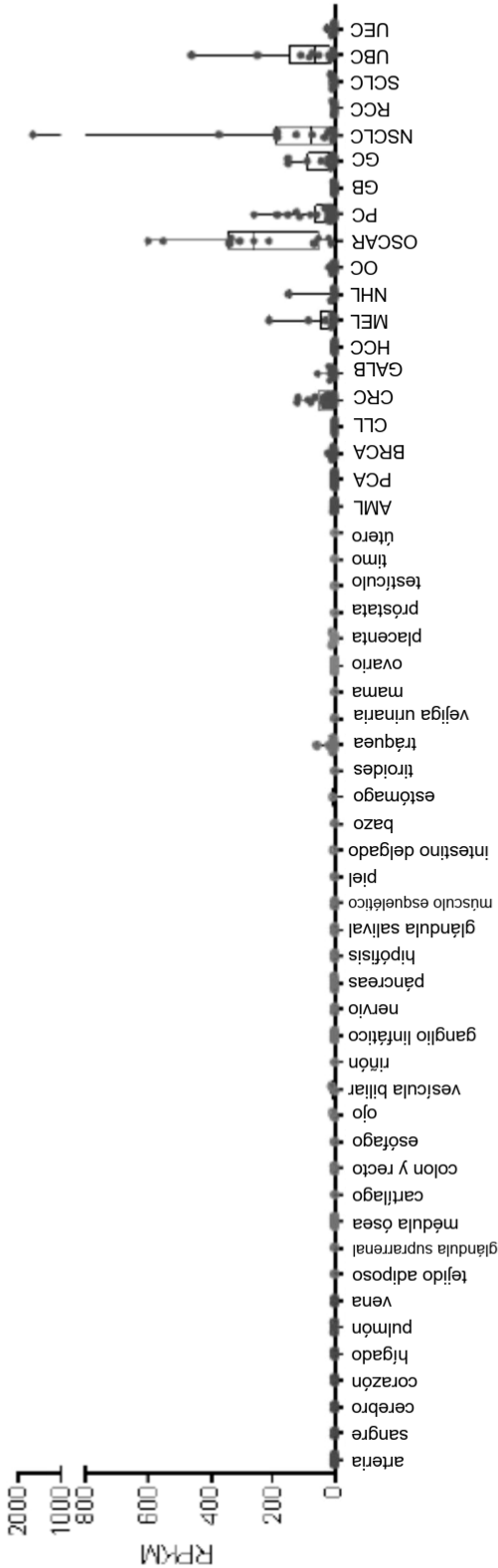
Figura 5A
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

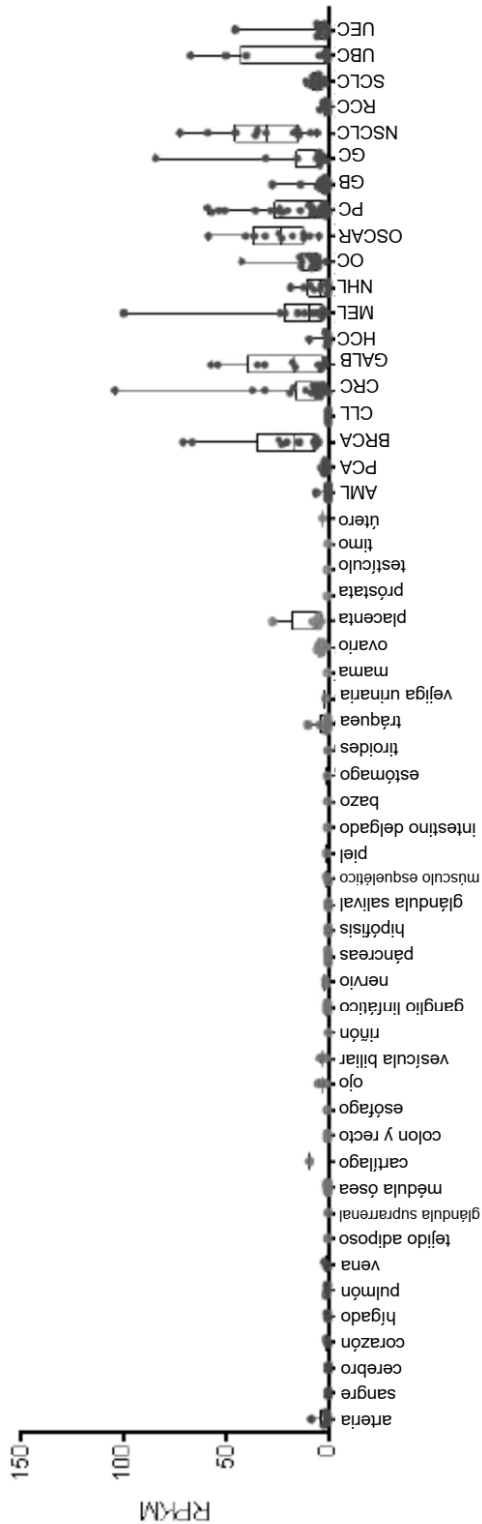
Figura 5B
SEQ ID NO: 14: MMP1-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; múscl.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

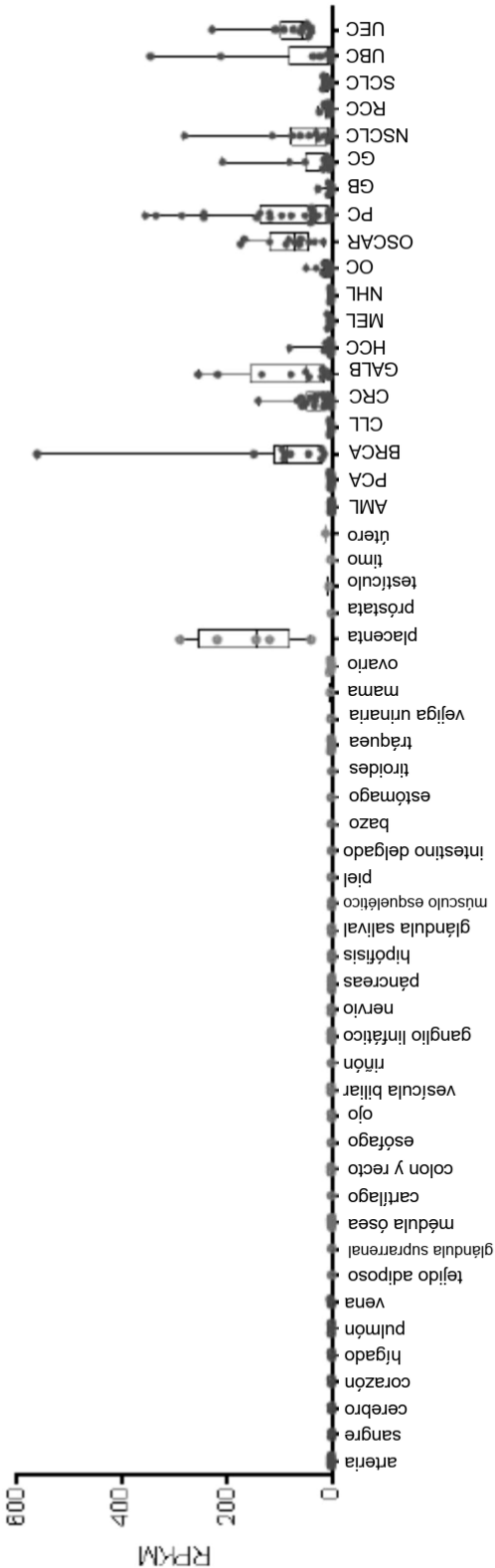
Figura 5C
SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

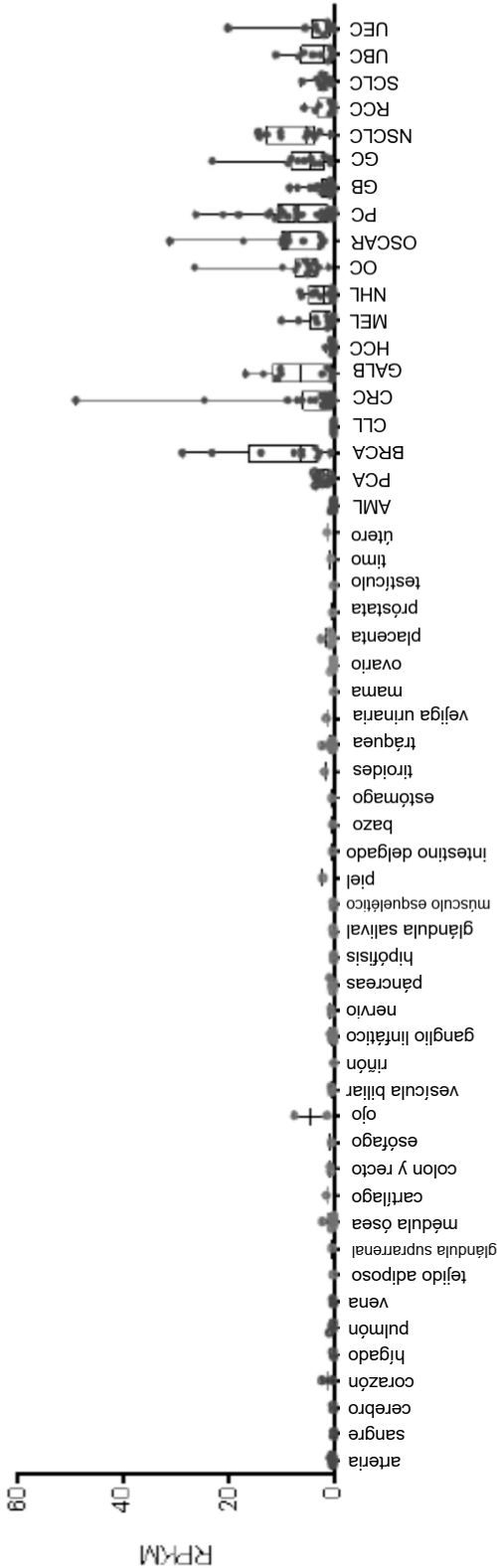
Figura 5D
SEQ ID NO: 24: MMP-002



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

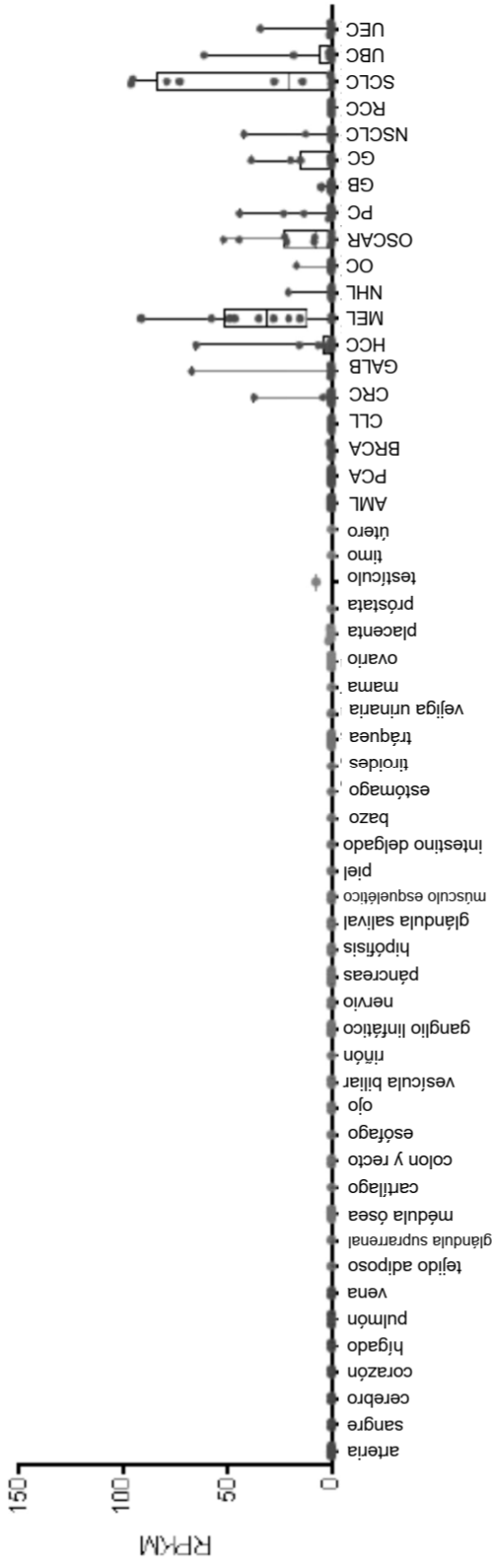
Figura 5E
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

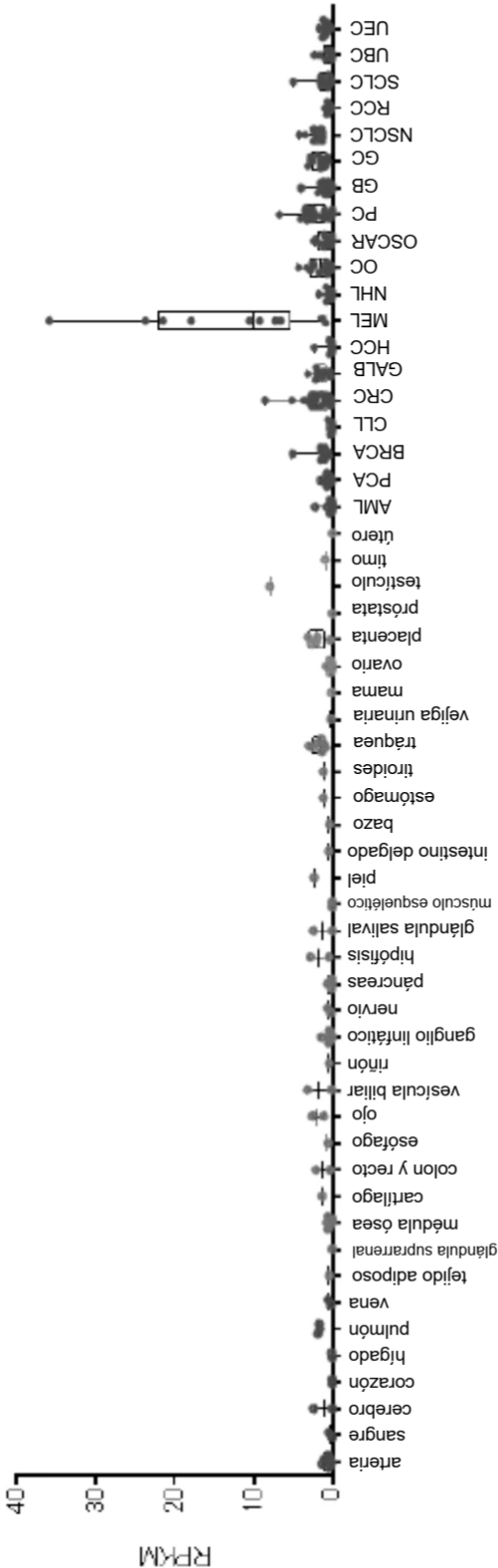
Figura 5F
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

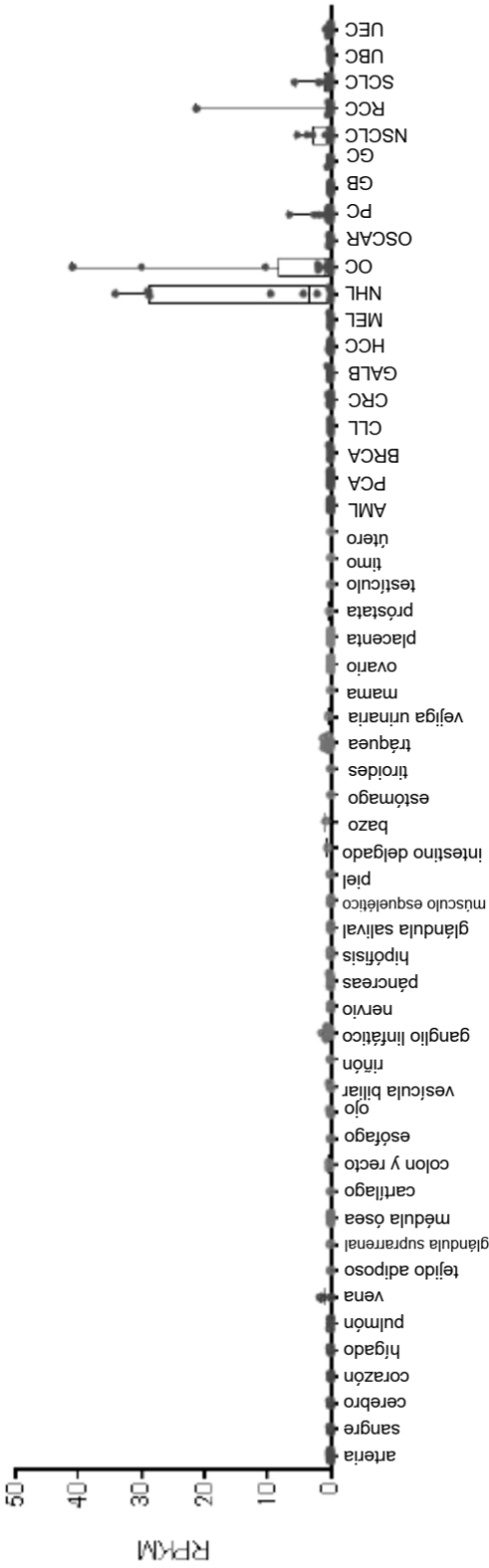
Figura 5G
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

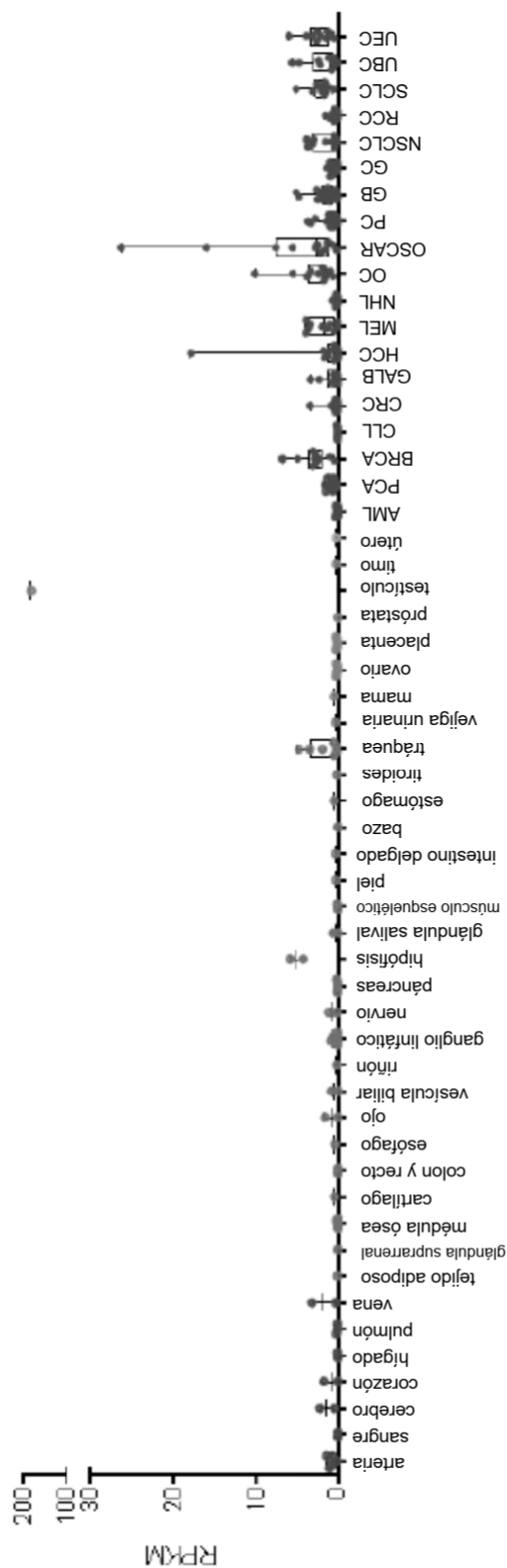
Figura 5H
SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

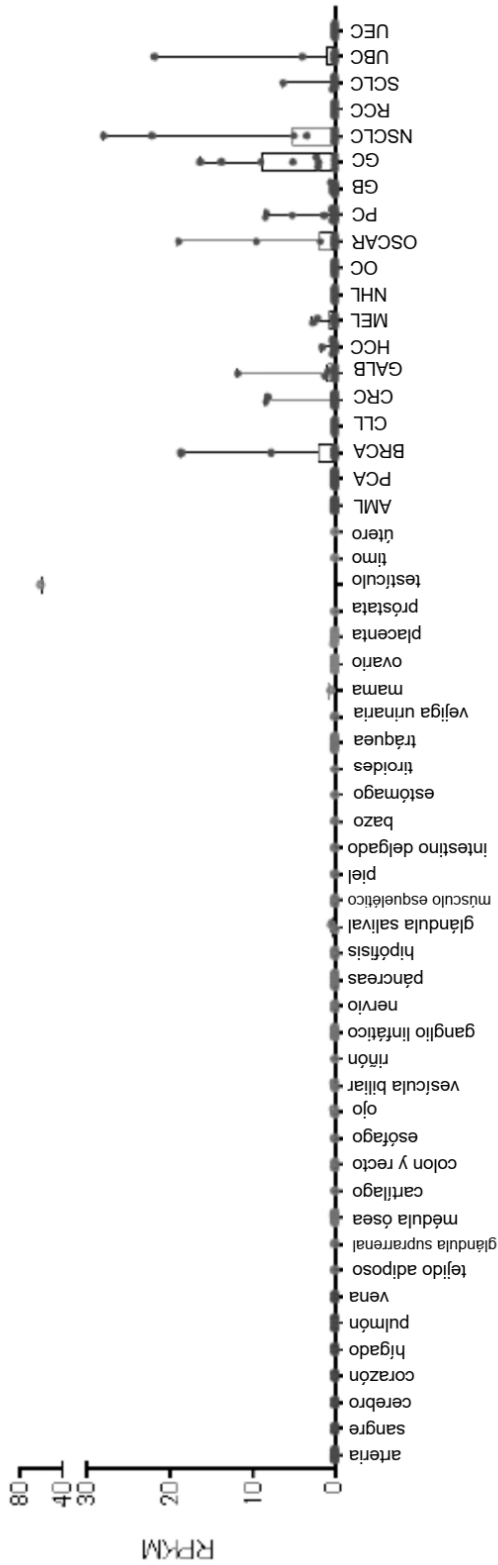
Figure 5I
SEQ ID NO: 117: CABY-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; múscl.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

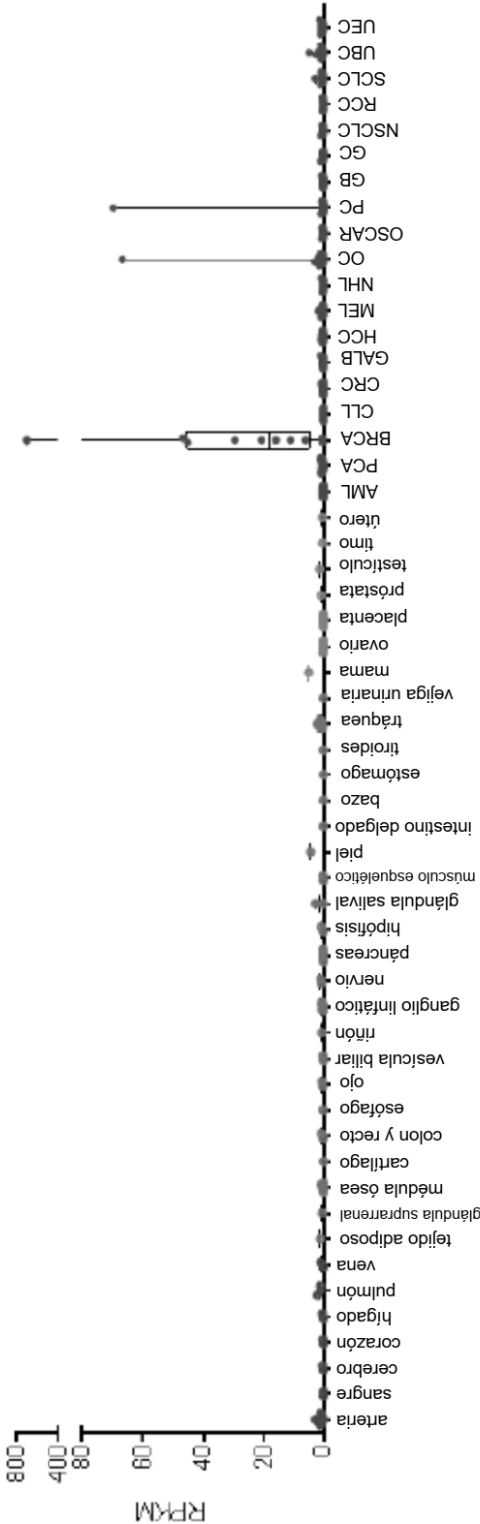
Figura 5J
SEQ ID NO: 153: CT83-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

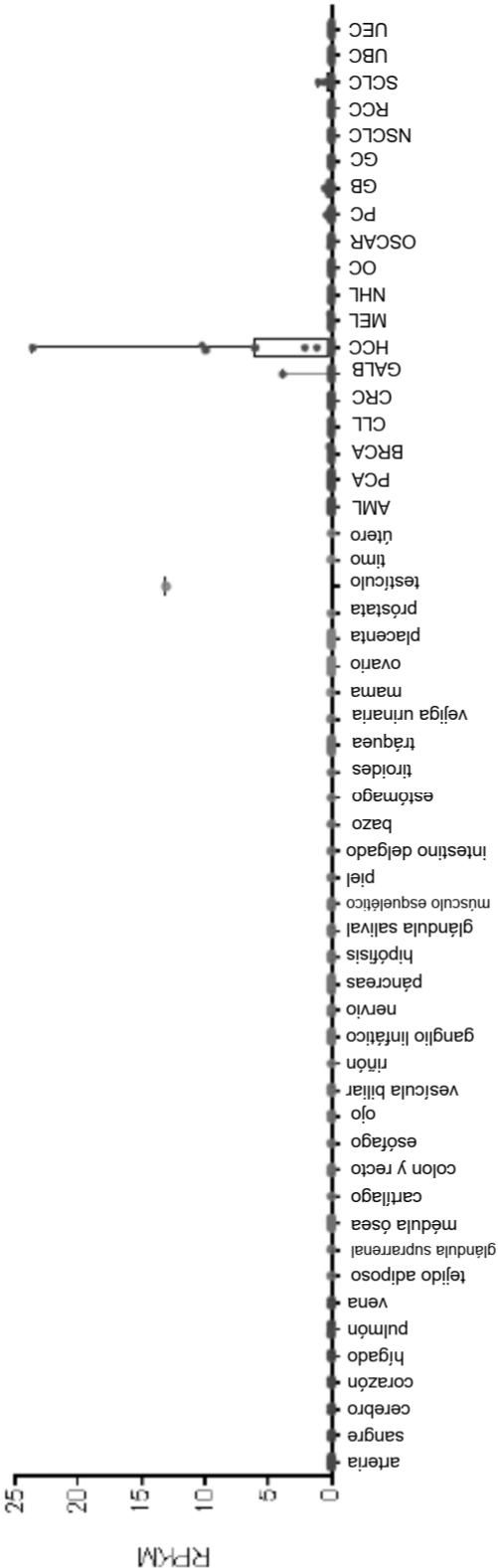
Figura 5K
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

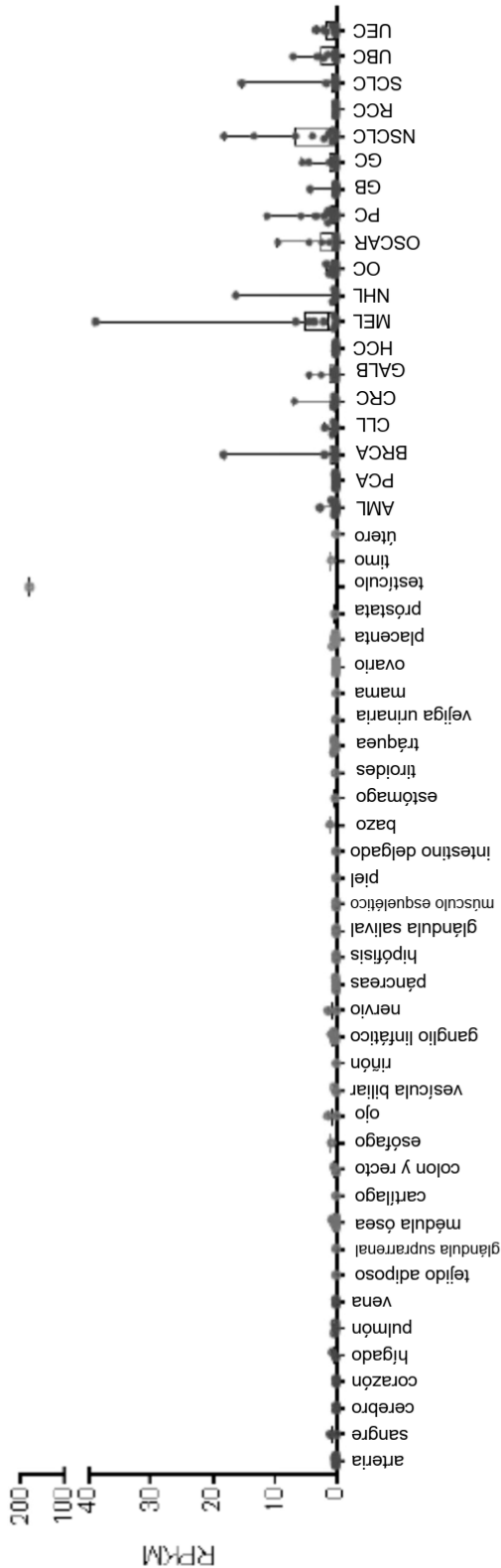
Figura 5L
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UEC; UBC

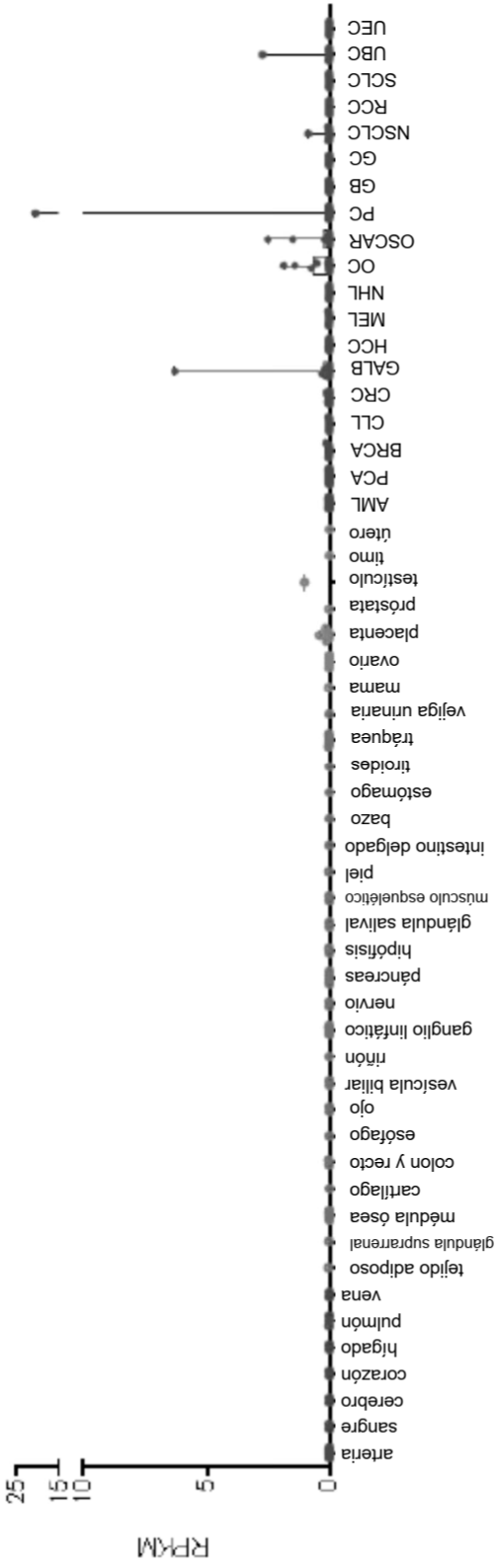
Figura 5M
SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

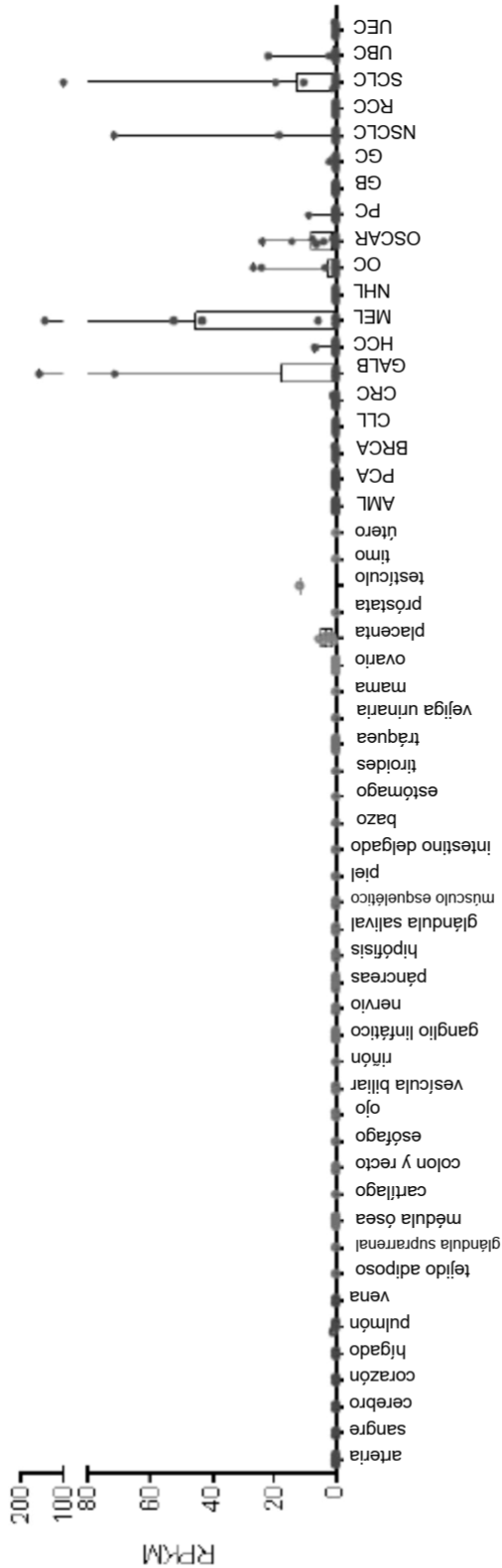
Figura 5N
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipofisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; BRCA; PCA; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 50
SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5P
SEQ ID NO: 253: RAD54B-002

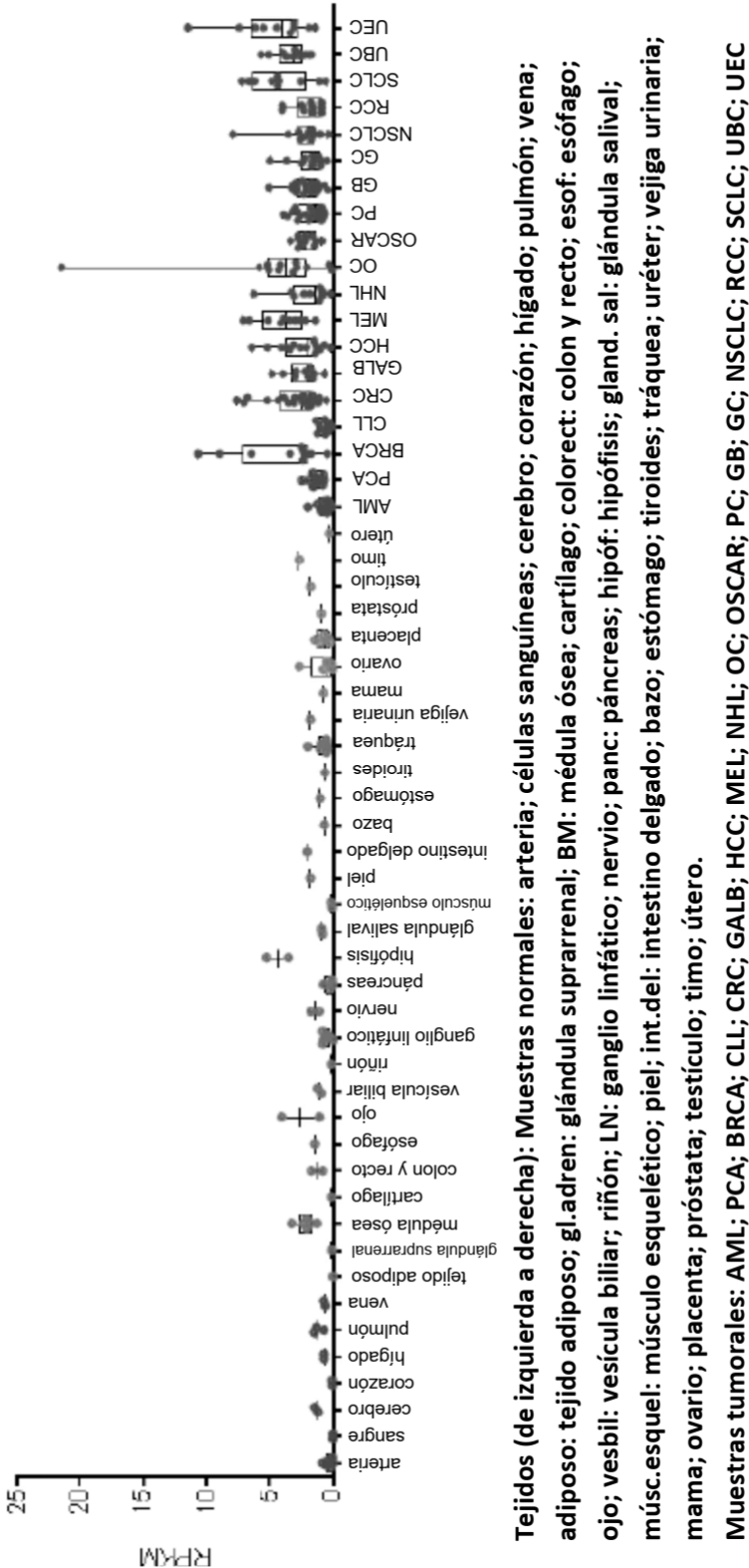
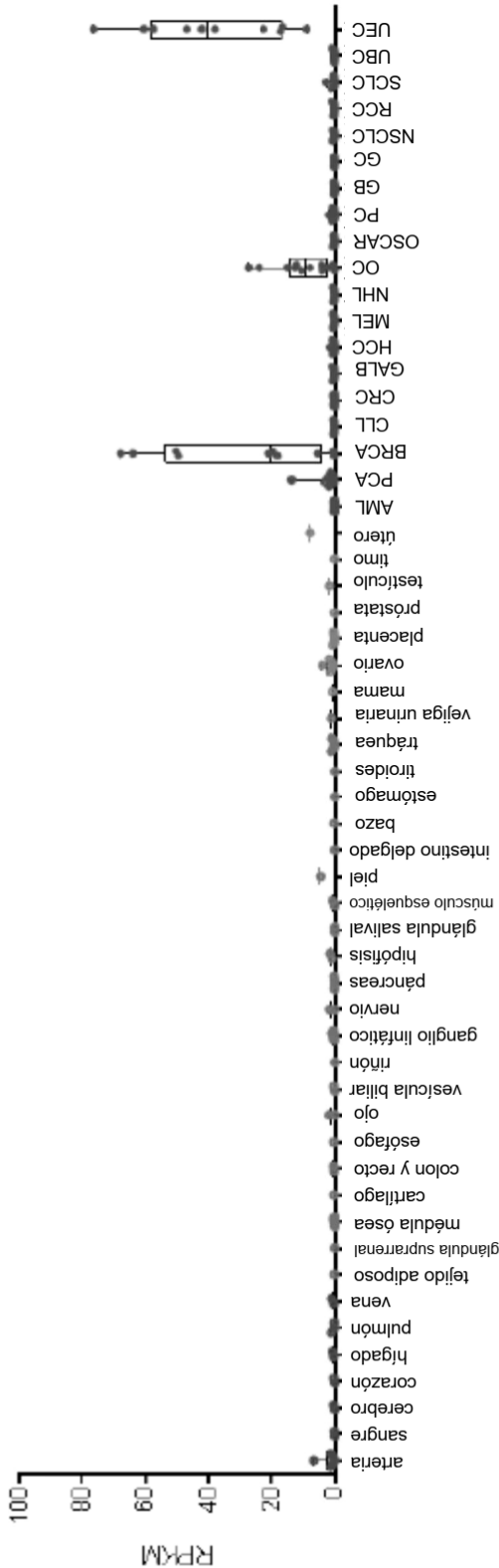


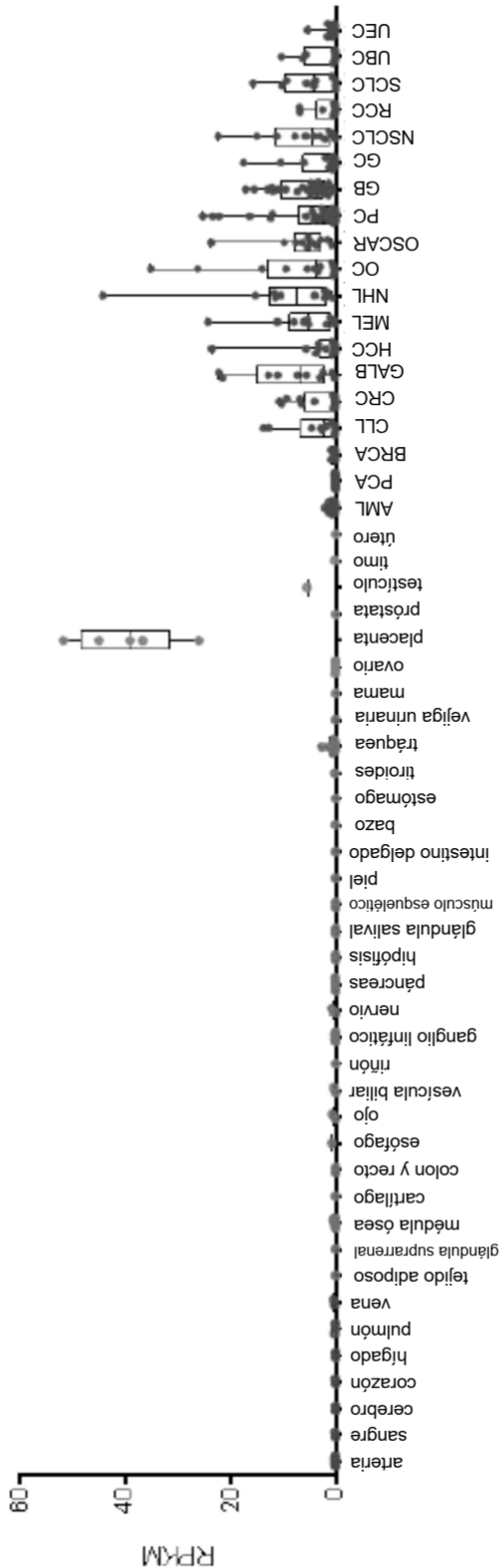
Figura 5Q
SEQ ID NO: 264: ESR1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músq.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5R
SEQ ID NO: 274: IGF-004



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.adren: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colorect: colon y recto; esof: esófago; ojo; vesbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; hipóf: hipófisis; gland. sal: glándula salival; músc.esquel: músculo esquelético; piel; int.del: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga urinaria; mama; ovario; placenta; próstata; testículo; timo; útero.

Muestras tumorales: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 6

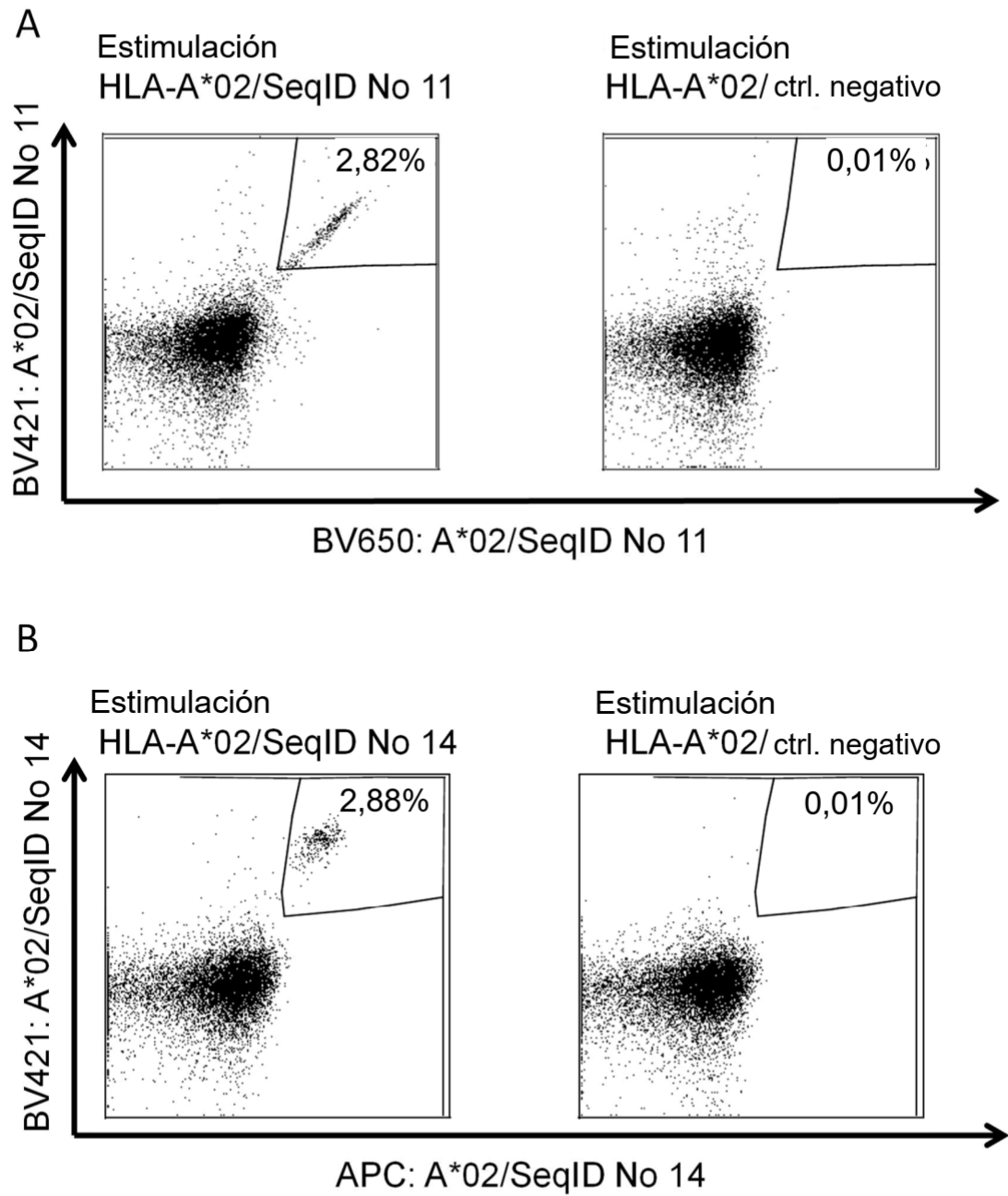


Figura 6 (continuación)

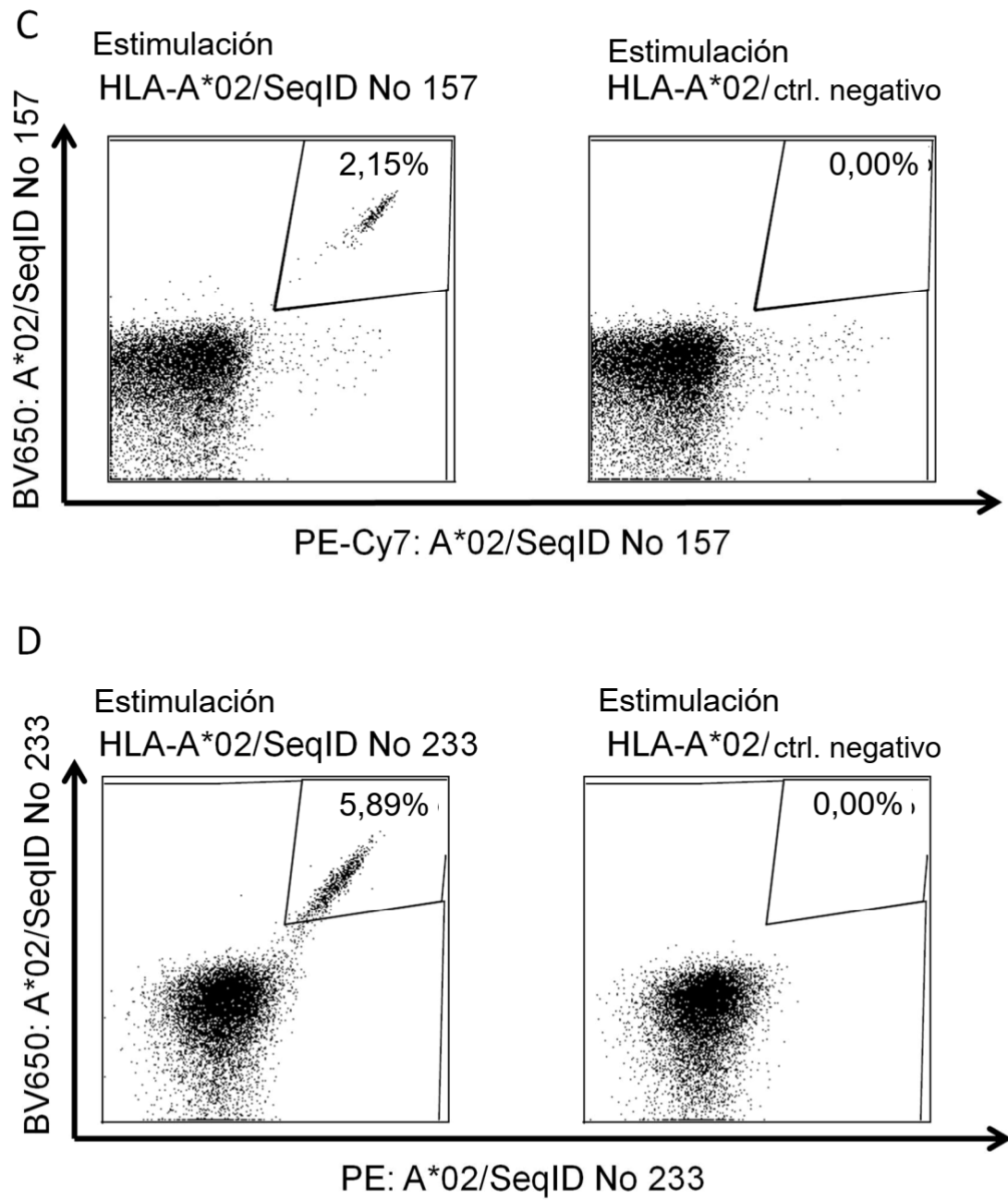


Figura 6 (continuación)

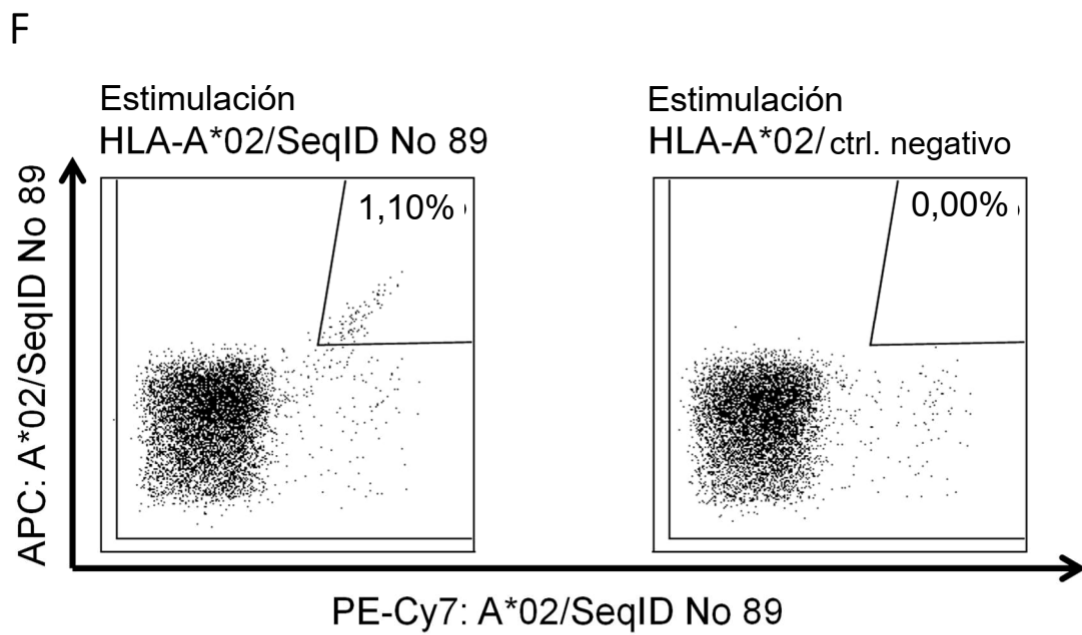
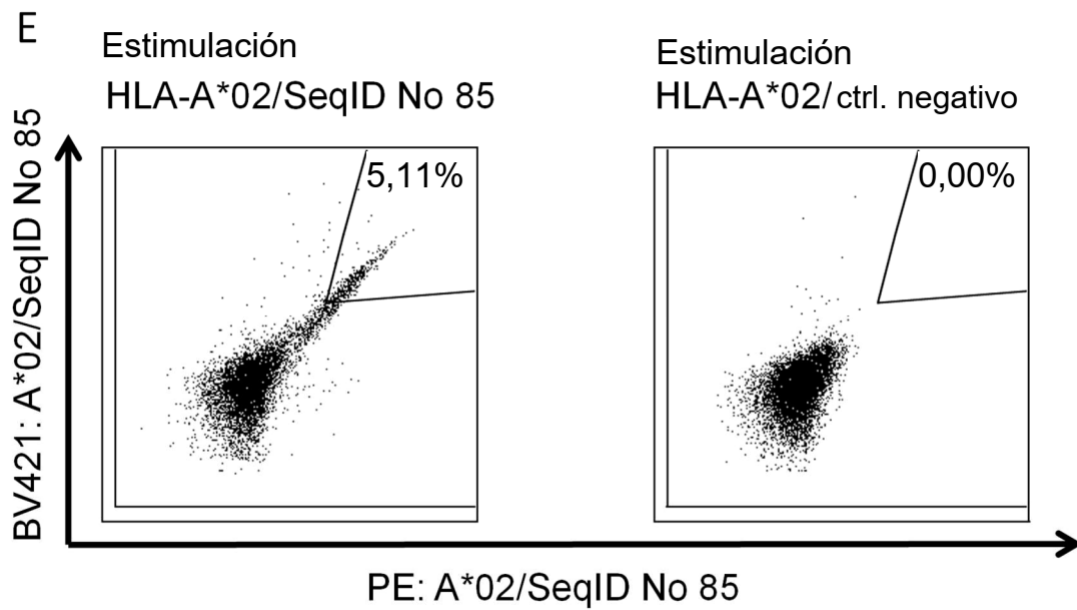


Figura 6 (continuación)

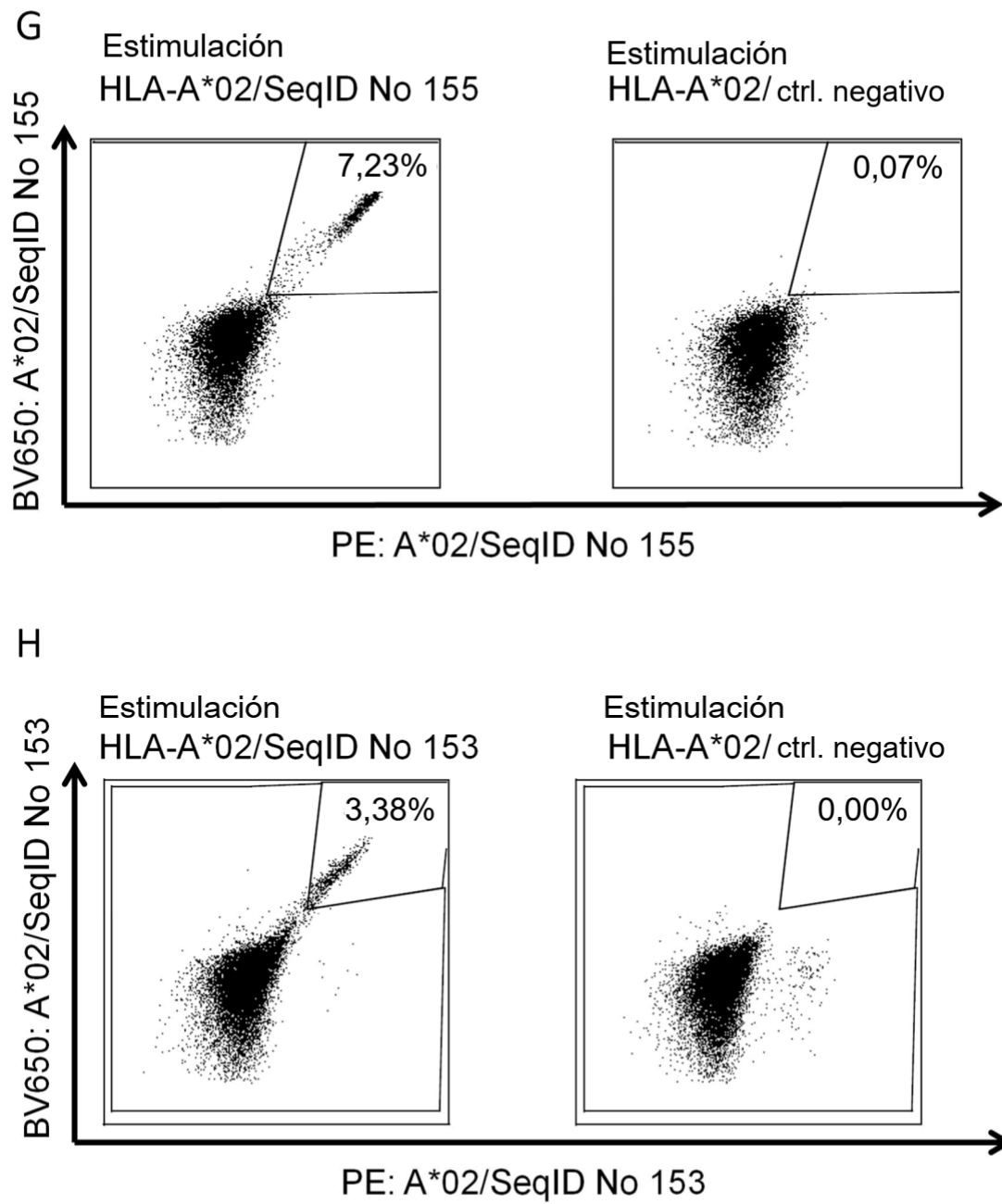


Figura 6 (continuación)

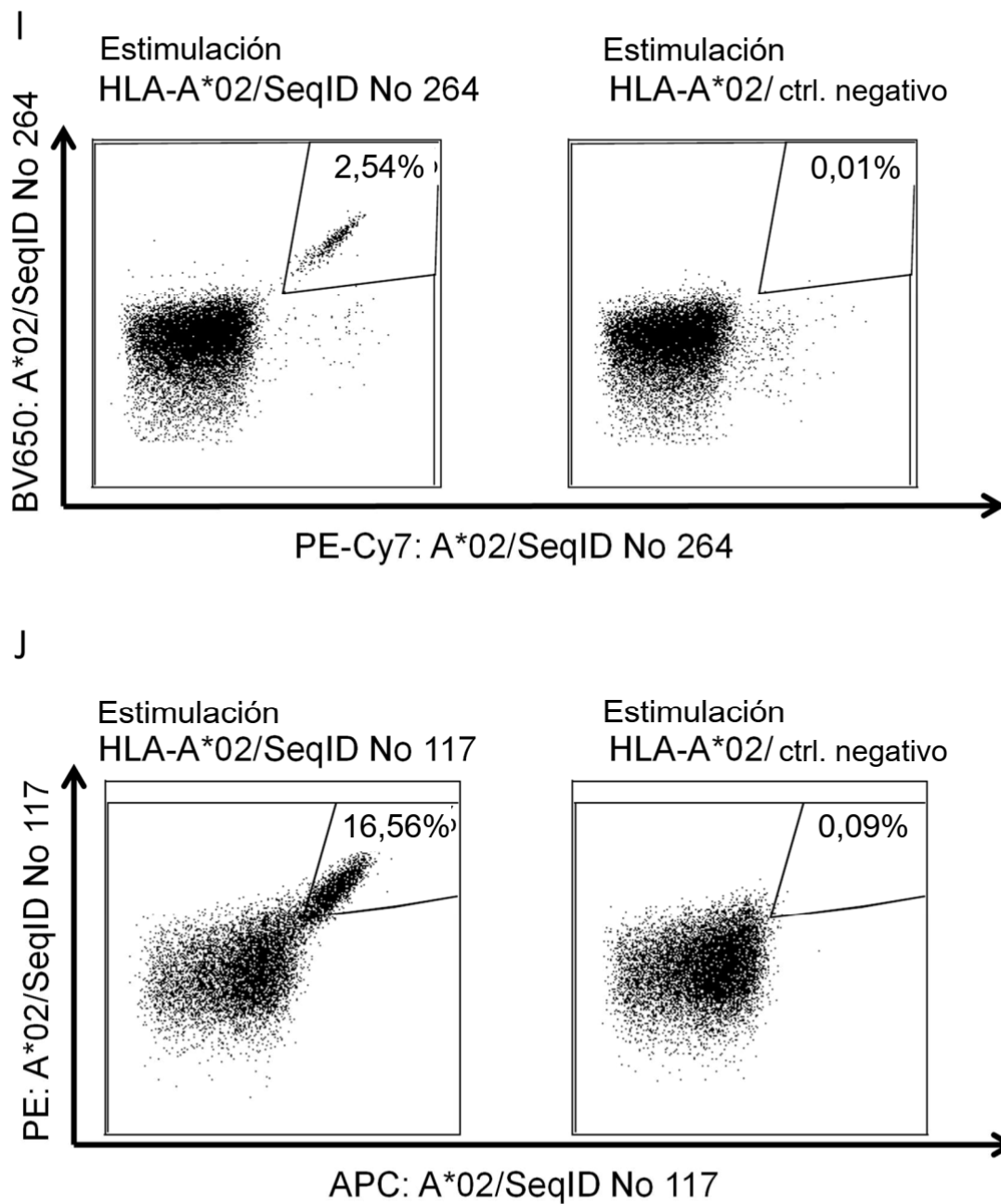


Figura 6 (continuación)

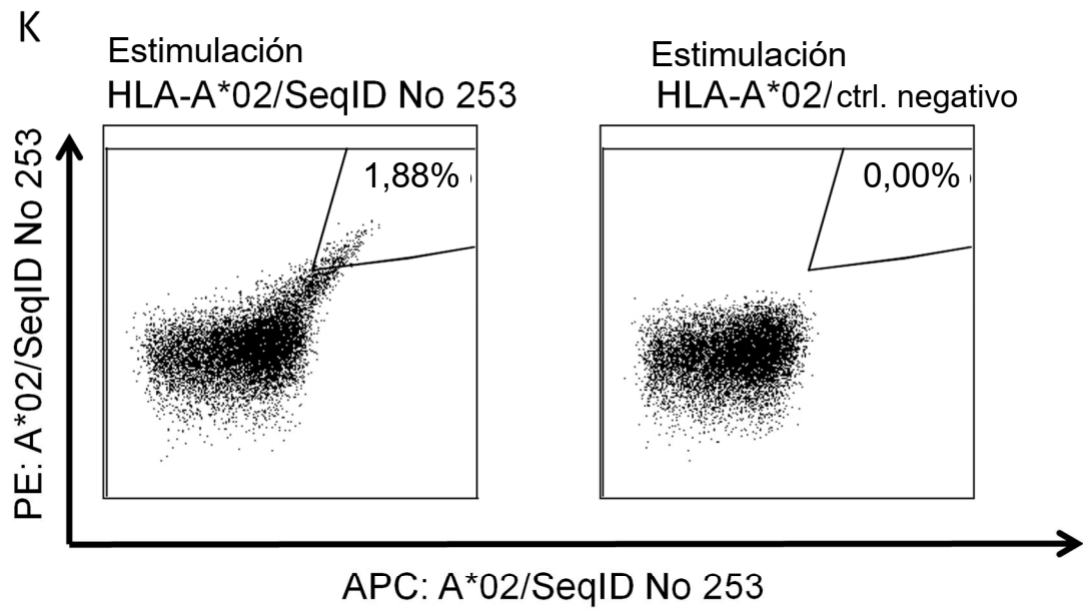


Figura 6 (continuación)

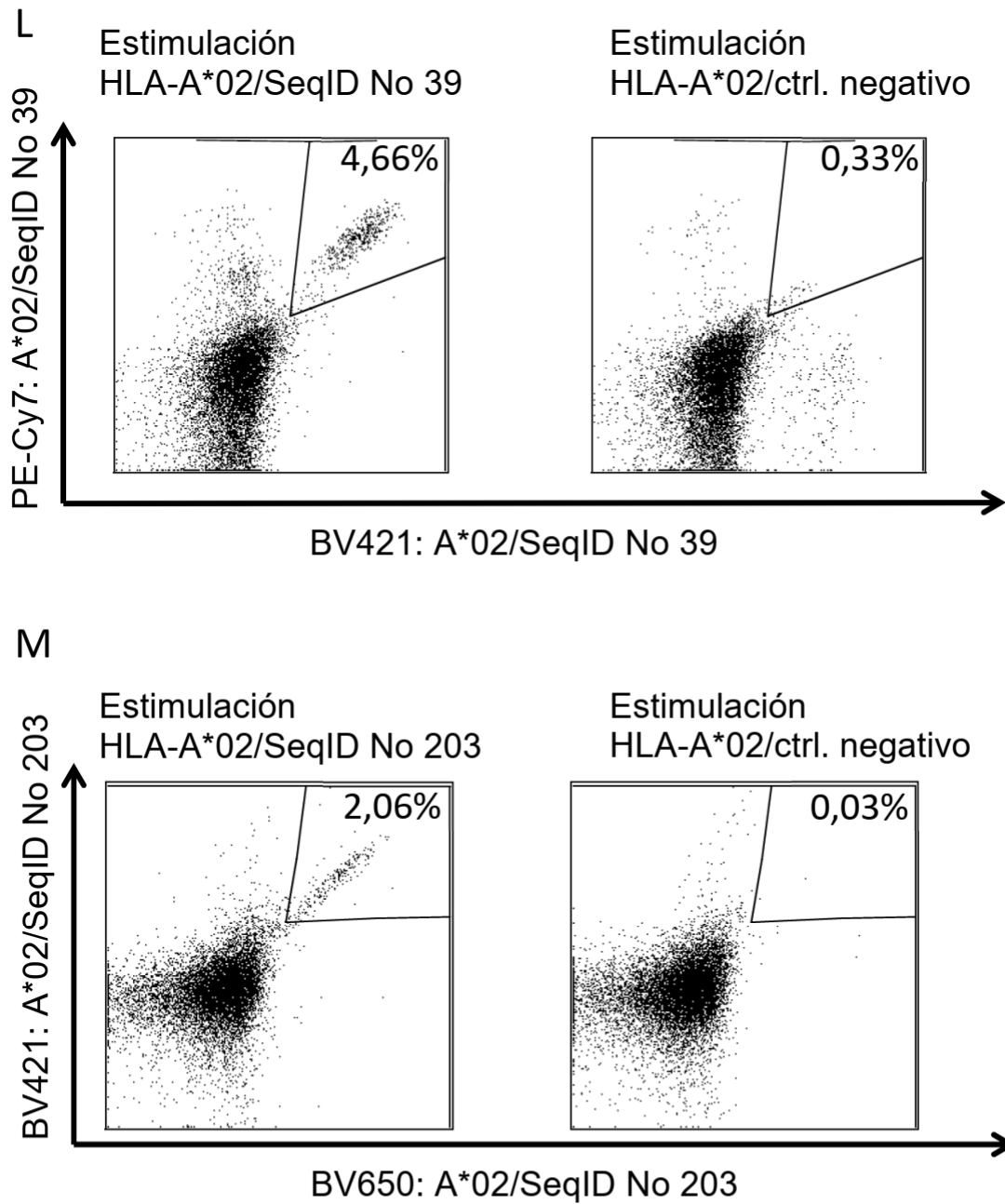


Figura 7A

Péptido: LLIPFTIFM (A*02)
SEQ ID NO: 43

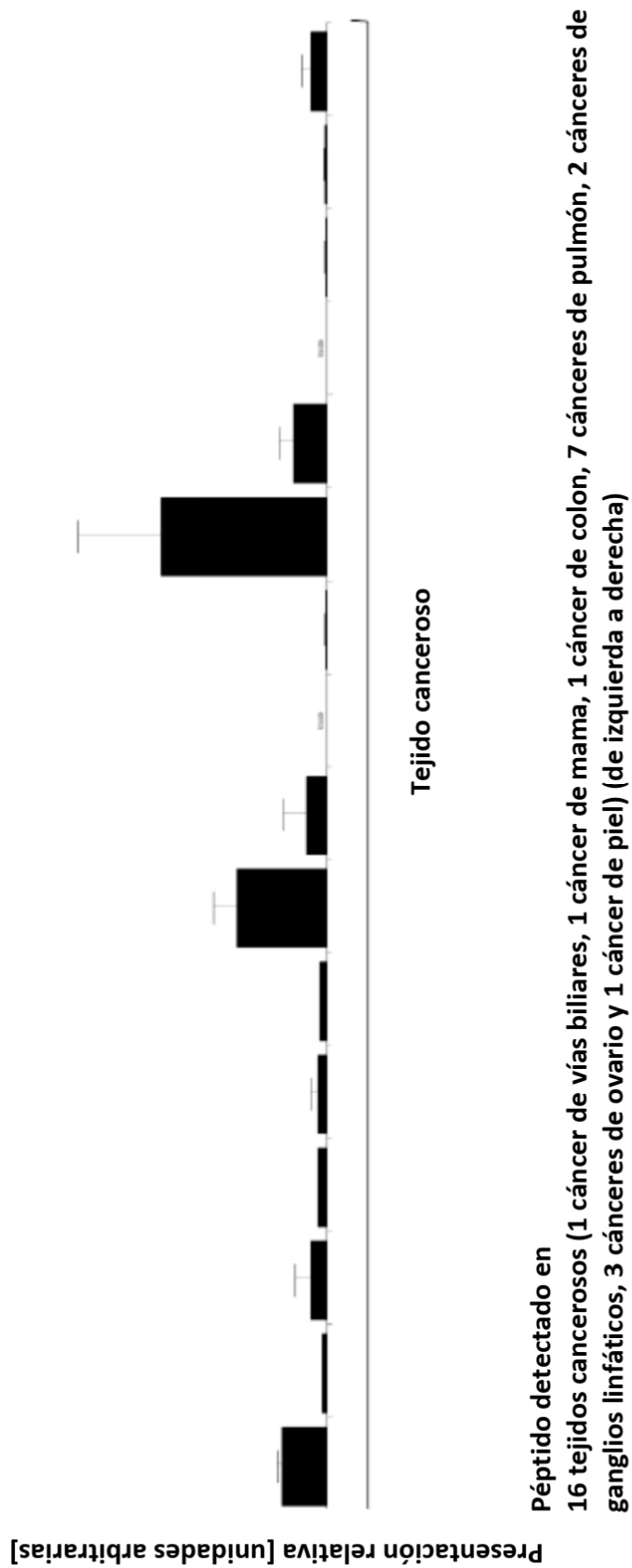


Figura 7B

Péptido: ILVTSIFFL (A*02)
SEQ ID NO: 152

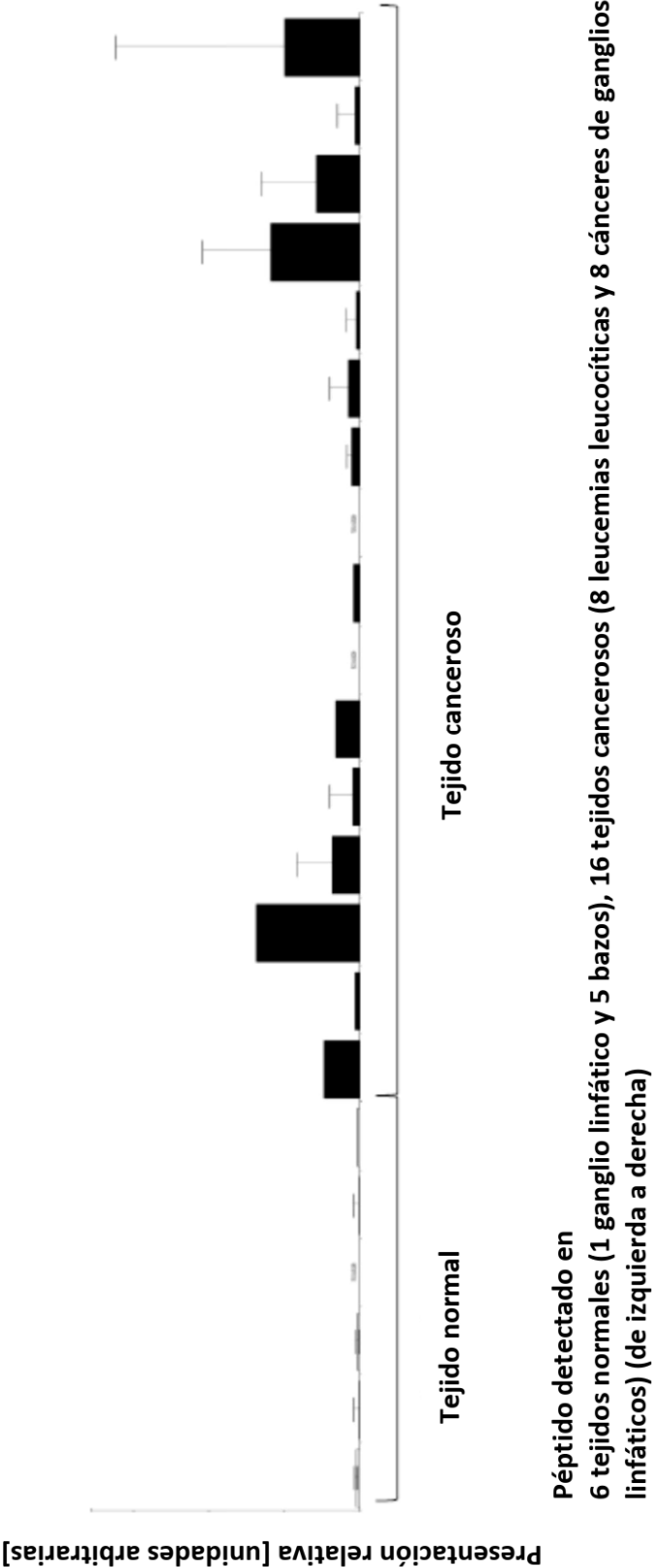


Figura 7C

Péptido: VILTSSPFL (A*02)
SEQ ID NO: 156

