(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 763 911**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2015 PCT/EP2015/080018**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102272**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2015 E 15813809 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3236985**

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

(30) Prioridad:

23.12.2014 GB 201423016
23.12.2014 US 201462096165 P
21.01.2015 GB 201501017

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

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

La presente invención se refiere a péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y células destinados a su uso en procedimientos 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 se transferirán a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos por sí mismos, también pueden ser dianas de anticuerpos, receptores de linfocitos T solubles y otras moléculas de unión. En particular, la presente invención se refiere a varias secuencias peptídicas novedosas y a sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I y clase II de células tumorales humanas que se pueden utilizar en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica o inmunitariamente activos.

Antecedentes de la invención

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

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

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

La incidencia del CHC está relacionada con diversos factores de riesgo, siendo la cirrosis el más importante. La cirrosis suele estar vinculada al alcoholismo o a la infección por los virus de la hepatitis B o C, pero también puede tener su causa en metabolopatías como la diabetes de tipo II. Como resultado, el tejido hepático sano es sustituido por tejido cicatricial, lo que aumenta el riesgo de aparición del cáncer.

El tratamiento de la enfermedad depende del estadio tumoral en el momento del diagnóstico y del estado general del hígado. Cuando es posible se extirpa una parte del órgano (hepatectomía parcial), o bien entero (hepatectomía total). Los pacientes aptos para recibir un trasplante hepático son aquellos que presentan tumores pequeños o totalmente resecables.

Cuando la extirpación quirúrgica no es una opción viable, existen otros tratamientos disponibles. Para la ablación del tumor, se introduce una sonda en el hígado y el tumor se destruye con radiación, microondas o crioterapia. En los procedimientos de embolización se interrumpe la irrigación sanguínea del tumor con medios mecánicos o químicos. Como radioterapia también se pueden usar ondas de radio de alta energía para destruir el tumor.

La quimioterapia contra el CHC 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 CHC muestran una elevada resistencia a los antineoplásicos (Enguita-German y Fortes, 2014).

Las opciones terapéuticas contra el CHC avanzado irresecable se limitan a Sorafenib, un inhibidor de la tirosina-cinasa ligada a múltiples receptores (Chang y col., 2007; Wilhelm y col., 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 y col., 2014; Llovet y col., 2008).

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

Hasta la fecha se han realizado un contado número de ensayos de vacunación terapéutica. Butterfield y col. 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 y col., 2003; Butterfield y col., 2006). En otros dos estudios diferentes se sensibilizaron células dendríticas (CD) autólogas *ex vivo* con un lisado de tumor autólogo (Lee y col., 2005) o con un lisado de la estirpe celular de hepatoblastoma HepG2 (Palmer y col., 2009). Hasta el momento los ensayos de vacunación se han saldado con pequeñas mejoras en los resultados clínicos.

El documento 2014/118552 desvela la secuencia íntegra de la proteína CFHR5 y su uso en terapéutica, incluido el tratamiento contra el cáncer, pero no desvela un péptido de CFHR5 que comprende la SEQ ID NO. 53 con una longitud de 10 a 30 aminoácidos.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, la presente invención concierne a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 53, y a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido tiene una longitud total de 10 a 30 aminoácidos, en que dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido, cuando está unido al MHC, se puede reconocer por linfocitos T CD8.

Las tablas siguientes muestran los péptidos desvelados, sus respectivas SEQ ID NO., y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 se unen a los alelos HLA-A*02, y los péptidos de la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*24. Los péptidos de la Tabla 3 han sido desvelados con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no se habían vinculado en absoluto con el cáncer hasta ahora. Se unen a alelos HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 4 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con el péptido de la invención. Los péptidos se unen a A*02 o, si se indica, a A*24. Los péptidos de la Tabla 5 además son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otras neoplasias malignas que expresan en exceso o presentan en exceso el correspondiente polipéptido subyacente.

Tabla 1: Péptidos HLA-A*02, la SED ID N.º 53 es de acuerdo con la presente invención – S* = fosfoserina

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	VMAPFTMTI	338	APOB
2	KLQAGTVFV	10840	ALDH1L1
3	ILDDNMQKL	79611	ACSS3
4	KLQDFSDQL	338	APOB
5	ALVEQGFTV	338	APOB
6	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
7	ALVDTLKFV	338	APOB
8	KLLEEATISV	54808	DYM
9	ALANQKLYSV	23195	MDN1
10	SLLEEFDFHV	8615	USO1
11	SLSQELVGV	24149	ZNF318
12	FLAELAYDL	2719	GPC3
13	GLIDTETAMKAV	3290	HSD11B1
14	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
15	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
16	SLLGGNIRL	2181	ACSL3

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
17	RVASJPTSGV	8660	IRS2
18	ALYGKTEVV	57513	CASKIN2
19	FLEETKATV	338	APOB
20	KLSNVLQQV	338	APOB
21	QLIEVSSPITL	338	APOB
22	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
23	RLYDPASGTISL	23456	ABCB10
24	SLAEEKLQASV	2194	FASN
25	SLDGKAALTEL	338	APOB
26	SLLHTIYEV	85407	NKD1
27	TLPDFRLPEI	338	APOB
28	TLQDHLNSL	338	APOB
29	YIQDEINTI	338	APOB
30	YLGEGPRMV	5704	PSMC4
31	YQMDIQQEL	338	APOB
32	ALNAVRLLV	9368	SLC9A3R1
33	LLHGHIVEL	57678	GPAM
34	SLAEGTATV	540	ATP7B
35	SLQESILAQV	23644	EDC4
36	ILNVDGLIGV	47	ACLY
37	LLLPLLPPLSP	347252	IGFBPL1
38	ALADVVHEA	26873	OPLAH
39	ALDPKANFST	10188	TNK2
40	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
41	ALLELDEPLVL	2158	F9
42	ALLGGNVRMML	2182	ACSL4
43	ALLGVWTSV	444	ASPH
44	ALQDAIRQL	51268	PIPOX
45	ALQDQLVLV	183	AGT
46	AMAEMKVVL	11283, 4051, 57834, 66002, 8529	CYP4F8,CYP4F3,CYP4F11,CYP4F12,CYP4F2
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
48	FLLEQPEIQV	5345	SERPINF2
49	FLYPEKDEPT	338	APOB
50	FTIPKLYQL	338	APOB
51	GLAEELVRA	5091	PC
52	GLFNAELLEA	3929	LBP
53	GLIHLEGDTV	81494	CFHR5
54	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
55	GLYGRTIEL	55908	C19orf80
56	GVLPGLVGV	162515	SLC16A11
57	HLTEAIQYV	6097	RORC
58	ILADLNLSV	55705	IPO9
59	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
60	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
61	KIADFELPTI	338	APOB
62	KIAGTNAEV	2752	GLUL
63	KIDEKNFVV	5887	RAD23B
64	KILEETLYV	8443	GNPAT
65	KLFSGDELLEV	8777	MPDZ
66	KLHEEIDRV	1571	CYP2E1
67	KLKETIQKL	338	APOB
68	KLLAATVLLL	336	APOA2
69	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
70	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
71	KLLDNWDSV	335	APOA1
72	KLSEAVTSV	55258	THNSL2
73	KLTLVIISV	8647	ABCB11
74	KLYDLELIV	570	BAAT
75	KQMEPLHAV	284111	SLC13A5
76	LLADIGGDPFAA	3268	AGFG2
77	LLHEENFSV	6942	TCF20
78	LLIDDEYKV	23065	EMC1
79	LLLSTGYEA	23556	PIGN
80	LLYEGKLTL	440107	PLEKHG7

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
81	NLASFIEQVAV	5092	PCBD1
82	NVFDGLVRV	338	APOB
83	QLHDFVMSL	8647	ABCB11
84	QLTPVLVSV	1244	ABCC2
85	RILPKVLEV	10840	ALDH1L1
86	RLAAFYSQV	91289	LMF2
87	RLFEENDVNL	5053	PAH
88	RLIDRIKTV	60560	NAA35
89	RLIEEIKNV	347051	SLC10A5
90	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
91	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
92	RLPPDTLLQQV	5986	RFNG
93	RLYTMDGITV	1571	CYP2E1
94	RMSDVVKGV	113251	LARP4
95	SICNGVPMV	54575, 54576, 54577, 54578, 54579, 54600, 54657, 54658, 54659	UGT1A10,UGT1A8,UGT1A7,UGT1A6,UGT1A5,UGT1A9,UGT1A4,UGT1A1,UGT1A3
96	SLLEEPNVIRV	4703	NEB
97	SLLPQLIEV	338	APOB
98	SLLSPEHLQYL	7512	XPNPEP2
99	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
100	SLVGDIGNVNM	1401	CRP
101	SLWEGGVRGV	411	ARSB
102	SLWSVARGV	57678	GPAM
103	SMGDHLWVA	2752	GLUL
104	SVWFGPKEV	28982	FLVCR1
105	SVYDGKLLI	5445	PON2
106	TLAAIIHGA	5243	ABCB1
107	TLGQFYQEV	3700, 375346	ITIH4,TMEM110
108	TLLKKISEA	84675	TRIM55
109	TLYALSHAV	338	APOB
110	TVGGSEILFEV	1401	CRP
111	TVMDIDTSGTFNV	26063, 4833	DECR2,NME4
112	VLGEVKVGV	122622	ADSSL1

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
113	VLMDKLVEL	338	APOB
114	VLSQVYSKV	338	APOB
115	VVLDDKDYFL	100292290, 3336	HSPE1
116	WVIPAISAV	1528	CYB5A
117	YAFPKSITV	6566	SLC16A1
118	YLDDEKNWGL	5005	ORM2
119	YLDKNLTVSV	100293534, 720, 721	C4A,C4B
120	YLGEEYVKA	7018	TF
121	YLITGNLEKL	1314	COPA
122	YLSQAADGAKVL	2584	GALK1
123	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
124	LLIDVVTYL	338	APOB
125	ALYGRLEVV	23294	ANKS1A
126	TLLDSPIKV	338	APOB
127	VLIGSNHSL	9919	SEC16A
128	GLAFSLNGV	81502	HM13
129	SQADVIPAV	55034	MOCOS
130	ALDAGAVYTL	10840	ALDH1L1
131	ALDSGAFQSV	55907	CMAS
132	ALHEEVVGV	1593	CYP27A1
133	ALLEMDARL	54512	EXOSC4
134	ALLETNPYLL	1209	CLPTM1
135	ALLGKIEKV	2590	GALNT2
136	ALLNQHYQV	2058	EPRS
137	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
138	ALSQVTLLL	392636	AGMO
139	ALSSKPAEV	256987	SERINC5
140	ALTSISAGV	392636	AGMO
141	AMGEKSFSV	57720	GPR107
142	AVIGGLIYV	366	AQP9
143	FILPDSLPLDTL	6632	SNRPD1
144	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2,ATP1A3
145	FLIAEYFEHV	23743, 635	BHMT2,BHMT

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
146	FLWTEQAHTV	3953	LEPR
147	GLAPGGLAVV	58525	WIZ
148	GLFAPLVFL	6566	SLC16A1
149	GLLSGLDIMEV	383	ARG1
150	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
151	HLAKVTAEV	6184	RPN1
152	KLDNNLDSV	80232	WDR26
153	KLIEVNEEL	100507203	SMLR1
154	KLTDHLKYV	3250	HPR
155	LLEPYKPPSAQ	439	ASNA1
156	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
157	QLLPNLRAV	5092	PCBD1
158	RIISGLVKV	101060372, 2330	FMO5
159	RLFPDGIVTV	152831	KLB
160	RLLAKIICL	3075	CFH
161	RLLDEQFAV	9026	HIP1R
162	RLMSALTQV	9462	RASAL2
163	RLTESVLYL	368	ABCC6
164	RMLIKLLEV	6710, 6711	SPTB,SPTBN1
165	RVIEHVEQV	3034	HAL
166	SILDIVTKV	130132	RFTN2
167	SLAESSFDV	54658	UGT1A1
168	SLAVLVPIV	1361	CPB2
169	SLFEWFHPL	2519	FUCA2
170	SLHNGVIQL	1314	COPA
171	SLIPAVLTV	57462	KIAA1161
172	SLLNFLQHL	2968	GTF2H4
173	SLTSEIHFL	55755	CDK5RAP2
174	TLAELGAVQV	2875	GPT
175	TLFEHLPHI	2888	GRB14
176	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
177	VLDEPYEKV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
178	YIFTTPKSV	22862	FNDC3A
179	YIHNILYEV	160518	DENND5B
180	YLGPHIASVTL	81671	VMP1
181	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11,DDX12P
182	YLLHFPMAL	1109	AKR1C4
183	YLYNNEEQVGL	1109	AKR1C4
184	VVLDGGQIVTV	6506	SLC1A2
185	ALFPALRPGGFQA	8878	SQSTM1
186	VLLAQIIQV	89797	NAV2

Tabla 2: Péptidos HLA-A*24 de acuerdo con la presente invención con los números de SEQ ID

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
187	SYPTFFPRF	6596	HLTF
188	RYSAGWDAKF	8630	HSD17B6
189	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
190	RYNEKCFKL	54800	KLHL24
191	KYPDIISRI	3978	LIG1
192	SYITKPEKW	79694	MANEA
193	IYPGAFVDL	51360	MBTPS2
194	QYASRFVQL	10733	PLK4
195	RYAPPPSFSEF	29066	ZC3H7A
196	AYLKWISQI	60561	RINT1
197	RWPKKSAEF	100132742, 100526842, 6139, 645296, 645441	RPL17P7, RPL17-C18orf32, RPL17, RPL17P39, RPL17P6
198	LYWSHPRKF	6235, 648343	RPS29, RPS29P9
199	KFVTVQATF	718	C3
200	AYLLQPSQF	732	C8B
201	AYVNTFHNI	1201	CLN3
202	AYGTYRSNF	9919	SEC16A
203	YYGILQEKI	10237	SLC35B1
204	KYRLTYAYF	2266	FGG
205	VYGLQRNLL	57159, 84675, 84676	TRIM54, TRIM55, TRIM63

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
206	KWPETPLLL	55757	UGGT2
207	IYLERFPIF	51096	UTP18
208	SYNPAENAVLL	1314	COPA
209	VFHPRQELI	1314	COPA
210	AYPAIRYLL	7818	DAP3
211	IYIPSYFDF	27042	DIEXF
212	VYGDVISNI	8893	EIF2B5
213	YYNKVSTVF	8661	EIF3A
214	IYVTSIEQI	55879	GABRQ
215	IYTGNISSF	8836	GGH
216	IYADVGEEF	100302182, 11052	MIR1279, CPSF6
217	DYIPYVFKL	338	APOB
218	VYQGAIRQI	338	APOB

Tabla 3: Péptidos adicionales de acuerdo con la presente invención sin vinculación previa conocida con el cáncer

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
219	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
220	SLLEKELESV	1819	DRG2
221	ALCEENMRGV	1938	EEF2
222	LTDITKGV	1938	EEF2
223	FLFNTENKLLL	3422	IDI1
224	ALASVIKEL	28981	IFT81
225	KMDPVAYRV	5859	QARS
226	AVLGPLGLQEV	79178	THTPA
227	ALLKVNQEL	25813	SAMM50
228	YLITSVELL	2182	ACSL4
229	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
230	VLTEFTREV	55705	IPO9
231	RLFNDPVAMV	10195	ALG3
232	KLAEIVKQV	8550	MAPKAPK5
233	ALLGKLDAI	5876	RABGGTB

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
234	YLEPYLKEV	727947,7381	UQCRB
235	KLFEEIREI	255394	TCP11L2
236	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
237	ALRGEIETV	10128	LRPPRC
238	AMPPPPPQGV	5885	RAD21
239	FLLGFIPAKA	5976	UPF1
240	FLWERPTLLV	79922	MRM1
241	FVLPLLGLHEA	55161	TMEM33
242	GLFAPVHKV	6249	CLIP1
243	GLLDNPELRV	26263	FBXO22
244	KIAELLENV	9100	USP10
245	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
246	KLISSYYNV	84928	TMEM209
247	KLLDTMVDTFL	100527963,11243	PMF1-BGLAP,PMF1
248	KLNDLIQRL	1314	COPA
249	LLLGERVAL	23475	QPRT
250	NLAEVVERV	26263	FBXO22
251	RLFADILNDV	64755	C16orf58
252	RTIEYLEEV	3030	HADHA
253	RVPPPPQSV	6464	SHC1
254	RVQEAIAEV	57678	GPAM
255	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
256	SLFQGVEFHYV	3930	LBR
257	SLLEKAGPEL	54625	PARP14
258	SLMGPVVHEV	5116	PCNT
259	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
260	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
261	VLFQEALWHV	2194	FASN
262	VLPNFLPYNV	10299	MARCH6
263	VLYPSLKEI	50717,5824	DCAF8,PEX19
264	VMQDPEFLQSV	266971,5710	PIPSL,PSMD4
265	WLIEDGKVVTV	10726	NUDC

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
266	SLLESNKDLLL	6520	SLC3A2
267	ALNENINQV	80025	PANK2
268	KLYQEVEIASV	5976	UPF1
269	YLMEGSYNKV	5714	PSMD8
270	SVLDQKILL	9875	URB1
271	LLLDKLILL	85440	DOCK7
272	QQLDSKFLEQV	6772	STAT1
273	AILETAPKEV	6238	RRBP1
274	ALAEALKEV	55164	SHQ1
275	ALIEGAGILL	10440	TIMM17A
276	ALLEADVNIKL	6729	SRP54
277	ALLEENSTPQL	83933	HDAC10
278	ALTSVVVTL	1021	CDK6
279	ALWTGMHTI	51479	ANKFY1
280	ATLNIIHSV	51542	VPS54
281	GLLAGDRLVEV	9368	SLC9A3R1
282	GQFPSYLETV	54919	HEATR2
283	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
284	KLDAFVEGV	528	ATP6V1C1
285	KLLDLSDSTSV	6093	ROCK1
286	KVLDKVFRA	375056	MIA3
287	LIGEFLEKV	8731	RNMT
288	LLDDSLVSI	25824	PRDX5
289	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
290	NLIDLDDLYV	57187	THOC2
291	QLIDYERQL	11072	DUSP14
292	RIPAYFVTV	7407	VARS
293	FLASESLIKQI	4736	RPL10A
294	RLIDLHTNV	23256	SCFD1
295	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
296	SLLSGRISTL	51133,92799	KCTD3,SHKBP1
297	TLFYSLREV	80233	C17orf70
298	TMAKESSIIGV	1429	CRYZ

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
299	ALLRVTPFI	401505	TOMM5
300	TLAQQPTAV	4802	NFYC

Tabla 4: Péptidos útiles, entre otros usos, en terapias personalizadas contra el cáncer

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
301	VLADFGARV	114899,23600	C1QTNF3,AMACR
302	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
303	GVYDGEEHSV	4113	MAGEB2
304	SLIDQFFGV	9097	USP14
305	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
306	KLVEFDFLGA	10460	TACC3
307	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
308	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
309	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
310	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
311	FLIPIYHQV	31	ACACA
312	RLGIKPESV	1466	CSRP2
313	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
314	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
315	KVLDGSPIEV	29974	A1CF
316	LLREKVEFL	4779	NFE2L1
317	KLPEKWESV	26156	RSL1D1
318	KLNEINEKI	1373	CPS1
319	KLFNEFIQL	10885	WDR3
320	GLADNTVIAKV	6897	TARS
321	GVIAEILRGV	10528	NOP56
322	ILYDIPDIRL	10667	FARS2
323	KIIDEDGLLNL	5981	RFC1
324	RLFETKITQV	100293534,720,721	C4A,C4B
325	RLSEAIVTV	51249	TMEM69
326	ALSDGVHKI	55179	FAIM
327	GLNEEIARV	10403	NDC80

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
328	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
329	SLIEDLILL	64754	SMYD3
330	SMSADVPLV	5111	PCNA
331	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
332	AMLAVLHTV	60673	C12orf44
333	GLAEDIDKGEV	1938	EEF2
334	SILTIEDGIFEV	100287551,3306,3312	HSPA8P8,HSPA2,HSPA8
335	SLLPVDIRQYL	6773	STAT2
336	YLPTFFLTV	54898	ELOVL2
337	TLLAAEFLKQV	100288772,10574	CCT7P2,CCT7
338	KLFDSDPITVTV	1191	CLU
339	RLISKFDTV	1977	EIF4E
340	KVFDEVIEV	8908	GYG2
341	YLAIGIHEL	3034	HAL
342	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
343	LLLPDYYLV	27044	SND1
344	VYISSLALL (A*24)	10213	PSMD14
345	SYNPLWLRI (A*24)	259266	ASPM
346	LYQILQGIVF (A*24)	983	CDK1
347	ALNPADITV	51497	TH1L

La presente invención además concierne en general al péptido de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, cáncer de riñón, cáncer cerebral y/o leucemias.

Se desvelan los péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 300. Se desvelan los péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 124 (véase la Tabla 1), preferentemente para su unión a A*02, y del grupo consistente en las SEQ ID NO. 187 a SEQ ID NO. 218 (véase la Tabla 2) preferentemente para su unión a A*24, y sus usos en la inmunoterapia contra el CHC, el cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferentemente el CHC.

Tal y como se muestra a continuación en las Tablas 5A y B, muchos de los péptidos desvelados también se pueden ser utilizar en inmunoterapia para otras indicaciones. Las tablas presentan una relación de los péptidos seleccionados que se han descubierto en otros tipos de tumor o bien estén presentados en exceso (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, o bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente de las medias geométricas con respecto a los tejidos normales superior a 3. La presentación en exceso se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral que en la muestra normal con mayor presentación. Los tejidos normales en los que se contrastó la presentación en exceso fueron: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebro, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroidea, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

Tabla 5A: Péptidos desvelados y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer – S* = fosfoserina

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
1	VMAPFTMTI	Páncreas
6	KLSPTVVGL	Colon, recto
10	SLLEEFDFHV	Riñón
14	ALADLTGTVV	Riñón, cerebro, páncreas
15	LLYGHTVTV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
16	SLLGGNIRL	Cerebro, colon, recto
17	RVAS*PTSGV	Cerebro
22	RIAGIRGIQGV	Riñón, colon, recto
26	SLLHTIYEV	Colon, recto
30	YLGEGPRMV	Colon, recto, LLC
34	SLAEGTATV	Colon, recto
36	ILNVDGLIGV	Riñón, cerebro, colon, recto
39	ALDPKANFST	Riñón, cerebro
41	ALLELDEPLVL	Páncreas
43	ALLGVWTSV	Páncreas
47	FLDTPIAKV	Cerebro, colon, recto
51	GLAEELVRA	Cerebro
54	GLLDPNVKSIFV	Riñón, cerebro
55	GLYGRTIEL	Riñón
58	ILADLNLSV	Páncreas
59	ILADTFIGV	Colon, recto, páncreas
60	ILSPLSVAL	Riñón, páncreas
65	KLFSGDELLEV	Cerebro, colon, recto
69	KLLDEVTYLEA	Colon, recto
70	KLLDLETERILL	Colon, recto
72	KLSEAVTSV	Riñón
77	LLHEENFSV	Riñón, colon, recto
80	LLYEGKLTL	Colon, recto
81	NLASFIEQVAV	Riñón, colon, recto, páncreas
88	RLIDRIKTV	Cerebro, colon, recto
90	RLLDVLAPLV	Riñón

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
96	SLLEEPNVIRV	Riñón
101	SLWEGGVRGV	Cerebro
112	VLGEVKVGV	Riñón
116	WVIPAISAV	Riñón
119	YLDKNLTVSV	Riñón
121	YLITGNLEKL	Riñón, colon, recto, páncreas
123	YLWDLDHGFAGV	Cerebro, colon, recto
125	ALYGRLEVV	Cerebro, colon, recto
127	VLIGSNHSL	Colon, recto
133	ALLEMDARL	Riñón, cerebro, colon, recto
134	ALLETNPYLL	Cerebro
135	ALLGKIEKV	Cerebro, páncreas
137	ALPTVLVGV	Riñón, cerebro, colon, recto
138	ALSQVTLLL	Riñón
139	ALSSKPAEV	Colon, recto, páncreas
141	AMGEKSFSV	Cerebro
144	FIQLITGV	Páncreas
147	GLAPGGLAVV	Cerebro
148	GLFAPLVFL	Riñón
161	RLLDEQFAV	Cerebro
166	SILDIVTKV	Cerebro
169	SLFEWFHPL	Riñón, cerebro, colon, recto
170	SLHNGVIQL	Riñón
172	SLLNFLQHL	Riñón, colon, recto, LLC
173	SLTSEIHFL	LLC
176	TLGQIWDV	Cerebro, colon, recto, páncreas
177	VLDEPYEKV	Riñón
179	YIHNILYEV	Cerebro
181	YLLEKFVAV	Colon, recto
184	VVLDGGQIVTV	Cerebro
186	VLLAQIIQV	Riñón, cerebro, colon, recto
187	SYPTFFPRF	Riñón, cerebro
189	AFSPDSHYLLF	Riñón, cerebro

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
191	KYPDIISRI	Cerebro
192	SYITKPEKW	Riñón, cerebro
193	IYPGAFVDL	Cerebro
194	QYASRFVQL	Cerebro
195	RYAPPPSFSEF	Cerebro
196	AYLKWISQI	Cerebro
197	RWPKKSAEF	Riñón, cerebro
198	LYWSHPRKF	Riñón
199	KFVTVQATF	Cerebro
203	YYGILQEKI	Riñón, cerebro
206	KWPETPLLL	Riñón, cerebro
208	SYNPAENAVLL	Cerebro
214	IYVTSIEQI	Cerebro
219	GVMAGDIYSV	Riñón
220	SLLEKELESV	Cerebro
221	ALCEENMRGV	Riñón, cerebro, colon, recto
223	FLFNTENKLLL	Colon, recto
224	ALASVIKEL	Cerebro
229	KMFESFIESV	Riñón, cerebro, colon, recto
230	VLTEFTREV	Riñón, cerebro, colon, recto
231	RLFNDPVAMV	Cerebro, colon, recto
232	KLAEIVKQV	Colon, recto
233	ALLGKLDAI	Riñón, colon, recto
234	YLEPYLKEV	Riñón, cerebro, colon, recto
236	ALADKELLPSV	Riñón, colon, recto, páncreas
237	ALRGEIETV	Colon, recto
238	AMPPPPPQGV	Cerebro, colon, recto
239	FLLGFIPAKA	Cerebro
240	FLWERPTLLV	LLC
244	KIAELLENV	Cerebro, colon, recto
245	KLGAVFNQV	Cerebro
247	KLLDTMVDTFL	Colon, recto
248	KLNDLIQRL	Páncreas

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
249	LLLGERVAL	Colon, recto
250	NLAEVVERV	Cerebro, colon, recto, LLC
251	RLFADILNDV	Cerebro, colon, recto
255	SLFGQDVKAV	Riñón, cerebro, colon, recto
258	SLMGPVVHEV	Cerebro
259	TLITDGMRSV	Cerebro
260	TLMDMRLSQV	Riñón, cerebro, colon, recto
261	VLFQEALWHV	Colon, recto
266	SLLESNKDLLL	Colon, recto
268	KLYQEVEIASV	Cerebro
269	YLMEGSYNKV	Cerebro, colon, recto
270	SVLDQKILL	Riñón, cerebro
271	LLLDKLILL	Cerebro, colon, recto
272	QQLDSKFLEQV	Riñón, cerebro
274	ALAEALKEV	Colon, recto
275	ALIEGAGILL	Riñón, colon, recto, páncreas
276	ALLEADVNIKL	Páncreas
277	ALLEENSTPQL	Riñón
278	ALTSVVVTL	Riñón, cerebro
279	ALWTGMHTI	Riñón, cerebro
281	GLLAGDRLVEV	Riñón
282	GQFPSYLETV	Riñón, cerebro, colon, recto
283	ILSGIGVSQV	Páncreas
285	KLLDLSDSTSV	Riñón, colon, recto
286	KVLDKVFRA	Páncreas
287	LIGEFLEKV	LLC
288	LLDDSLVSI	Páncreas
289	LLLEEGGLVQV	Riñón, colon, recto, páncreas
290	NLIDLDDLYV	Cerebro, colon, recto, páncreas
291	QLIDYERQL	Riñón, colon, recto, páncreas
292	RIPAYFVTV	Riñón
293	FLASESLIKQI	Cerebro, colon, recto
295	SLFSSPPEI	Riñón, cerebro

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
296	SLLSGRISTL	Riñón
297	TLFYSLREV	Riñón, cerebro, colon, recto
299	ALLRVTPFI	LLC
300	TLAQQPTAV	Páncreas
301	VLADFGARV	Riñón, colon, recto
302	KIQEILTQV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
304	SLIDQFFGV	Cerebro, colon, recto, páncreas
305	GVLENIFGV	Riñón, cerebro
306	KLVEFDFLGA	Cerebro, colon, recto
308	ALLRTVVSV	Riñón, páncreas
309	GLIEIISNA	Cerebro
310	SLWGGDVVL	Cerebro, colon, recto
311	FLIPIYHQV	Riñón, cerebro
312	RLGIKPESV	Cerebro
313	LTAPPEALLMV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
315	KVLDGSPIEV	Riñón
316	LLREKVEFL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
317	KLPEKWESV	Cerebro, colon, recto, páncreas
319	KLFNEFIQL	Riñón, cerebro, colon, recto
321	GVIAEILRGV	Riñón, cerebro
324	RLFETKITQV	Riñón
325	RLSEAIVTV	Cerebro, páncreas
326	ALSDGVHKI	Páncreas
327	GLNEEIARV	Cerebro, colon, recto
328	RLEEDDGDVAM	Riñón, cerebro, colon, recto
329	SLIEDLILL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
330	SMSADVPLV	Cerebro, colon, recto
331	SLLAQNTSWLL	Cerebro, colon, recto, páncreas
332	AMLAVLHTV	Cerebro, colon, recto
333	GLAEDIDKGEV	Riñón, cerebro
334	SILTIEDGIFEV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
335	SLLPVDIRQYL	Riñón, LLC
336	YLPTFFLTV	Riñón, cerebro

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
337	TLLAAEFLKQV	Cerebro
338	KLFDSDPITVTV	Cerebro
339	RLISKFDTV	Cerebro
340	KVFDEVIEV	Cerebro
342	AMSSKFFLV	Cerebro, colon, recto, páncreas
343	LLLPDYYLV	Cerebro, páncreas
344	VYISSLALL (A*24)	Cerebro
345	SYNPLWLRI (A*24)	Cerebro
346	LYQILQGIVF (A*24)	Riñón
347	ALNPADITV	Cerebro

Tabla 5B: Péptidos desvelados y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
189	AFSPDSHYLLF	CPNM, cáncer de próstata
273	AILETAPKEV	Cáncer de esófago
236	ALADKELLPSV	CPNM, CPM, cáncer de estómago, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
14	ALADLTGTVV	CPNM, CPM, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
38	ALADVVHEA	Cáncer de mama, cáncer de ovario
274	ALAEALKEV	Cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, LMA
9	ALANQKLYSV	CPNM, cáncer de colon o recto, carcinoma de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas
224	ALASVIKEL	CPM, cáncer de páncreas, melanoma
221	ALCEENMRGV	CPNM, CPM, carcinoma de células de Merkel, melanoma
131	ALDSGAFQSV	Cáncer de colon o recto, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
185	ALFPALRPGGFQA	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
275	ALIEGAGILL	CPM, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, LNH
276	ALLEADVNIKL	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de ovario

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
277	ALLEENSTPQL	CPM, LLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH
133	ALLEMDARL	CPNM, CPM, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH
134	ALLETNPYLL	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
135	ALLGKIEKV	CPNM, CPM, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
233	ALLGKLDAI	LLC, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH
43	ALLGVWTSV	CPM, cáncer de cerebro, LLC, cáncer de mama, cáncer de páncreas
227	ALLKVNQEL	Melanoma, cáncer de útero
136	ALLNQHYQV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
299	ALLRVTPFI	LNH, cáncer de ovario
32	ALNAVRLLV	CPM
267	ALNENINQV	CPM, cáncer de cerebro, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
137	ALPTVLVGV	CPNM, cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas
45	ALQDQLVLV	CPM, cáncer de cerebro
237	ALRGEIETV	CPM, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH
139	ALSSKPAEV	Cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero
278	ALTSVVVTL	CPNM, CPM, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH
279	ALWTGMHTI	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
125	ALYGRLEVV	Cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
141	AMGEKSFSV	Melanoma
238	AMPPPPPQGV	CPNM, CPM, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
342	AMSSKFFLV	CPNM, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas
280	ATLNIIHSV	Cáncer de vejiga urinaria
226	AVLGPLGLQEV	Cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
202	AYGTYRSNF	CPNM
196	AYLKWISQI	CPNM
210	AYPAIRYLL	CPNM, cáncer de estómago
144	FIQLITGV	CPNM, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga urinaria
293	FLASESLIKQI	CPNM, cáncer de próstata, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas
47	FLDTPIAKV	CPNM, cáncer de estómago, cáncer de esófago
223	FLFNTENKLLL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, LNH
145	FLIAEYFEHV	CPM
239	FLLGFIPAKA	Cáncer de vejiga urinaria, LMA, LNH
128	GLAFSLNGV	Melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
147	GLAPGGLAVV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
148	GLFAPLVFL	Cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
242	GLFAPVHKV	Cáncer de vejiga urinaria
52	GLFNAELLEA	CPM
281	GLLAGDRLVEV	CPNM, CPM, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
243	GLLDNPELRV	Cáncer de vejiga urinaria
54	GLLDPNVKSIFV	CPNM, CPM, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
149	GLLSGLDIMEV	CPM
150	GLSNLGIKSI	Cáncer de vejiga urinaria, LNH
55	GLYGRTIEL	CPM
282	GQFPSYLETV	CPNM, LLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH
219	GVMAGDIYSV	CPM, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas
151	HLAKVTAEV	CPM, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
57	HLTEAIQYV	LNH
58	ILADLNLSV	Cáncer de mama
59	ILADTFIGV	CPNM, CPM, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
36	ILNVDGLIGV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
283	ILSGIGVSQV	CPNM, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas
216	IYADVGEEF	CPNM, cáncer de estómago, cáncer de próstata
211	IYIPSYFDF	CPNM, cáncer de cerebro, cáncer de estómago
207	IYLERFPIF	CPNM, cáncer de estómago
193	IYPGAFVDL	CPNM
214	IYVTSIEQI	CPNM, cáncer de células renales
244	KIAELLENV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, LLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, LMA, LNH
62	KIAGTNAEV	Cáncer de mama
63	KIDEKNFVV	CPM, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
64	KILEETLYV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
302	KIQEILTQV	CPNM, CPM, cáncer de estómago, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH, cáncer de páncreas
232	KLAEIVKQV	CPNM, CPM, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
284	KLDAFVEGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
152	KLDNNLDSV	Cáncer de mama, melanoma
235	KLFEEIREI	CPNM, cáncer de colon o recto, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
245	KLGAVFNQV	CPNM, CPM, cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
246	KLISSYYNV	Cáncer de ovario
69	KLLDEVTYLEA	Cáncer de vejiga urinaria
70	KLLDLETERILL	Cáncer de ovario, cáncer de útero
285	KLLDLSDSTSV	CPM, cáncer de útero
247	KLLDTMVDTFL	CPNM, CPM, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, LLC, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, LMA, LNH
8	KLLEEATISV	CPM, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
248	KLNDLIQRL	Cáncer de estómago, cáncer de útero
20	KLSNVLQQV	CPM
6	KLSPTVVGL	LLC, cáncer de ovario
154	KLTDHLKYV	CPM

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
268	KLYQEVEIASV	Cáncer de colon o recto, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
225	KMDPVAYRV	Cáncer de colon o recto, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
229	KMFESFIESV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
286	KVLDKVFRA	Cáncer de colon o recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
206	KWPETPLLL	Cáncer de estómago
191	KYPDIISRI	CPNM, cáncer de estómago
287	LIGEFLEKV	CPM, cáncer de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH
288	LLDDSLVSI	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, LMA
156	LLFPHPVNQV	CPNM, CPM, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
77	LLHEENFSV	CPNM, CPM, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
78	LLIDDEYKV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
271	LLLDKLILL	LLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
289	LLLEEGGLVQV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, LNH
249	LLLGERVAL	Cáncer de ovario
37	LLLPLLPPLSP	CPM, cáncer de páncreas, carcinoma de células de Merkel, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
80	LLYEGKLTL	Cáncer de ovario
15	LLYGHTVTV	CPNM, CPM, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH, cáncer de páncreas
222	LTDITKGV	Cáncer de mama, LNH
346	LYQILQGIVF	CPNM, cáncer de cerebro, cáncer de estómago
198	LYWSHPRKF	CPNM
250	NLAEVVERV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
81	NLASFIEQVAV	CPM, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero, LNH
290	NLIDLDDLYV	CPM, cáncer de próstata, carcinoma de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
291	QLIDYERQL	CPNM, CPM, cáncer de cerebro, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH, cáncer de páncreas
157	QLLPNLRAV	Cáncer de células renales

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
272	QQLDSKFLEQV	Carcinoma de células de Merkel, cáncer de ovario, LNH
194	QYASRFVQL	CPNM, cáncer de estómago
22	RIAGIRGIQGV	CPNM, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, LNH
292	RIPAYFVTV	Cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma, LNH
86	RLAAFYSQV	LMA
251	RLFADILNDV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
231	RLFNDPVAMV	CPNM, CPM, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
294	RLIDLHTNV	Cáncer de esófago
88	RLIDRIKTV	CPNM, CPM, cáncer de ovario, LMA, LNH
89	RLIEEIKNV	CPM
161	RLLDEQFAV	CPM, cáncer de mama
90	RLLDVLAPLV	Cáncer de mama
91	RLPDIPLRQV	CPNM, LLC, cáncer de vejiga urinaria, LNH
92	RLPPDTLLQQV	Cáncer de vejiga urinaria
23	RLYDPASGTISL	LLC, melanoma, LNH
164	RMLIKLLEV	CPM, cáncer de colon o recto
94	RMSDVVKGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
252	RTIEYLEEV	Melanoma
17	RVAJPTSGV	LMA
197	RWPKKSAEF	CPNM
195	RYAPPPSFSEF	CPNM
190	RYNEKCFKL	CPNM
95	SICNGVPMV	Cáncer de vejiga urinaria
166	SILDIVTKV	CPM, LLC, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, LMA
24	SLAEEKLQASV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
169	SLFEWFHPL	CPNM, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
255	SLFGQDVKAV	CPNM, CPM, LLC, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas
256	SLFQGVEFHYV	Cáncer de colon o recto, LLC, carcinoma de células de Merkel, LNH

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
295	SLFSSPPEI	CPNM, CPM, Cáncer de colon o recto, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
170	SLHNGVIQL	CPNM, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, LNH
331	SLLAQNTSWLL	CPNM, cáncer de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
10	SLLEEFDFHV	CPNM, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero
96	SLLEEPNVIRV	Melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
257	SLLEKAGPEL	LLC, melanoma, cáncer de ovario
220	SLLEKELESV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, LLC, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, LNH
266	SLLESNKDLLL	CPM, carcinoma de células de Merkel, cáncer de útero
16	SLLGGNIRL	Cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
26	SLLHTIYEV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, LNH
172	SLLNFLQHL	LMA
97	SLLPQLIEV	CPM
296	SLLSGRISTL	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
258	SLMGPVVHEV	CPM, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, LNH
35	SLQESILAQV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, LMA
99	SLSAFLPSL	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
11	SLSQELVGV	Cáncer de cerebro, melanoma, cáncer de útero, LNH
173	SLTSEIHFL	Cáncer de útero, LNH
101	SLWEGGVRGV	Melanoma
103	SMGDHLWVA	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, LNH
330	SMSADVPLV	CPNM, CPM, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH
129	SQADVIPAV	Cáncer de vejiga urinaria
270	SVLDQKILL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
104	SVWFGPKEV	CPM, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
192	SYITKPEKW	CPNM
208	SYNPAENAVLL	CPNM
345	SYNPLWLRI	CPNM, cáncer de células renales, cáncer de estómago

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
187	SYPTFFPRF	CPNM, cáncer de próstata
300	TLAQQPTAV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
297	TLFYSLREV	Cáncer de mama, cáncer de útero, LMA
176	TLGQIWDV	CPNM, cáncer de estómago, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
259	TLITDGMRSV	Cáncer de células renales, cáncer de colon o recto, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas
260	TLMDMRLSQV	CPM, cáncer de próstata, LLC, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
298	TMAKESSIIGV	CPM, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
110	TVGGSEILFEV	CPM, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
111	TVMDIDTSGTFNV	CPM, cáncer de colon o recto, LLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
209	VFHPRQELI	CPNM
261	VLFQEALWHV	Cáncer de vejiga urinaria
127	VLIGSNHSL	Cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, LMA
186	VLLAQIIQV	Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
262	VLPNFLPYNV	CPNM, CPM, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas
114	VLSQVYSKV	CPM
230	VLTEFTREV	CPNM, CPM, LLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
263	VLYPSLKEI	Cáncer de células renales, cáncer de mama, cáncer de útero
1	VMAPFTMTI	CPM, melanoma, LNH
264	VMQDPEFLQSV	CPM, cáncer de colon o recto, cáncer de páncreas, LLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH
115	VVLDDKDYFL	LLC
344	VYISSLALL	CPNM, cáncer de estómago, cáncer de colon o recto
265	WLIEDGKVVTV	Melanoma
117	YAFPKSITV	Cáncer de páncreas
178	YIFTTPKSV	LMA
179	YIHNILYEV	LLC, LNH

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Entidades adicionales
341	YLAIGIHEL	CPM
234	YLEPYLKEV	CPNM, CPM, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LMA, LNH, cáncer de páncreas
30	YLGEGPRMV	CPNM, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
180	YLGPHIASVTL	Melanoma
121	YLITGNLEKL	CPNM, LLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, LNH, cáncer de páncreas
228	YLITSVELL	Cáncer de ovario, LNH
181	YLLEKFVAV	CPNM, CPM, LLC, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, LMA, LNH
269	YLMEGSYNKV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
123	YLWDLDHGFAGV	CPNM, CPM, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, LMA, LNH
31	YQMDIQQEL	CPM
203	YYGILQEKI	CPNM
213	YYNKVSTVF	CPNM

CPNM = cáncer de pulmón no microcítico, CPM = cáncer de pulmón microcítico, LNH = linfoma no de Hodgkin, LMA = leucemia mieloide aguda, LLC = leucemia linfocítica crónica.

Se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 14, 15, 41, 43, 58, 59, 60, 81, 121, 135, 139, 144, 176, 236, 248, 275, 276, 283, 286, 288, 289, 290, 291, 300, 302, 304, 308, 313, 316, 317, 325, 326, 329, 331, 334, 342 y 343 para –en una realización preferida combinada– el tratamiento del cáncer de páncreas.

Se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 6, 15, 16, 22, 26, 30, 34, 36, 47, 59, 65, 69, 70, 77, 80, 81, 88, 121, 123, 125, 127, 133, 137, 139, 169, 172, 176, 181, 186, 221, 223, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 240, 244, 247, 249, 250, 251, 255, 260, 261, 266, 269, 271, 274, 275, 282, 285, 289, 290, 291, 293, 297, 301, 302, 304, 306, 310, 313, 316, 317, 319, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 334 y 342 para –en una realización preferida combinada– el tratamiento del cáncer de colon o renal.

Se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 10, 14, 15, 22, 36, 39, 54, 55, 60, 72, 77, 81, 90, 96, 112, 116, 119, 121, 133, 137, 138, 148, 169, 170, 172, 177, 186, 187, 189, 192, 197, 198, 203, 206, 219, 221, 229, 230, 233, 234, 236, 255, 260, 270, 272, 275, 277, 278, 279, 281, 282, 285, 289, 291, 292, 295, 296, 297, 301, 302, 305, 308, 311, 313, 315, 316, 319, 321, 324, 328, 329, 333, 334, 335, 336 y 346 para –en una realización preferida combinada– el tratamiento del cáncer de riñón.

Se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 14, 15, 16, 17, 36, 39, 47, 51, 54, 65, 88, 101, 123, 125, 133, 134, 135, 137, 141, 147, 161, 166, 169, 176, 179, 184, 186, 187, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 199, 203, 206, 208, 214, 220, 221, 224, 229, 230, 231, 234, 238, 239, 244, 245, 250, 251, 255, 258, 259, 260, 268, 269, 270, 271, 272, 278, 279, 282, 295, 297, 302, 304, 305, 306, 309, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 319, 321, 325, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 337, 338, 339, 340, 342, 343, 344, 345 y 347 para –en una realización preferida combinada– el tratamiento del cáncer de cerebro.

Se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 172, 173, 240, 250, 287, 299, 302, 334 y 335 para –en una realización preferida combinada– el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC).

De forma similar, los péptidos enumerados en la Tabla 5B anterior pueden ser la base para el tratamiento de las enfermedades indicadas, en una realización preferida combinada.

Se desvela el uso de al menos un péptido para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo siguiente: CHC, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, y leucemia.

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos de acuerdo con la presente invención en la que cada uno de dichos péptidos consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO.53.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos de acuerdo con la presente invención, en la que dichos péptidos incluyen enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos de acuerdo con la presente invención, en la que dicho péptido es parte de una proteína de fusión, fusionado con los aminoácidos del extremo N de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii).

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

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico de acuerdo con a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias/inmunopatológicas.

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

La presente invención 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 con procedimientos para fabricarlos, así como con linfocitos citolíticos naturales (o linfocitos 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 realizaciones adicionales del uso inmunoterapéutico de los péptidos de acuerdo con la invención en cuestión.

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID NO. 53.

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

La presente invención desvela, además, un procedimiento para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma anómala un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el procedimiento la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T producidos de acuerdo con a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquier péptido como los descritos, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, del vector de expresión

de acuerdo con la presente invención, de la célula de acuerdo con la presente invención, del linfocito T activado, del receptor de linfocitos T o del anticuerpo o de otras moléculas que se unan al péptido o al complejo péptido-MHC de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, el medicamento es activo contra el cáncer.

Preferentemente, 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 invención se refiere, además, al uso de acuerdo con la presente invención, en que las células cancerosas son células de CHC, de cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferentemente células de CHC.

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que las APC capturan mediante endocitosis y después procesan. 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 auxiliares 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 auxiliares 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 epítopos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que estimulen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic S, y col. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jul 22;100(15):8862-7). Los linfocitos T auxiliares generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es adecuado para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara L, y col. CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. Clin Cancer Res. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3435-43) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos (Hwang ML, y col. Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):5829-38).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel J, y col. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4163-70).

Los péptidos alargados (más largos) pueden actuar como epítopos activos para las MHC de clase II. Los linfocitos T auxiliares, activados por epítopos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T auxiliares que desencadenan una respuesta de los linfocitos T auxiliares del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T auxiliares, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ).

Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller y col., 2013; Tran y col., 2014).

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

Los antígenos que reconocen los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son

expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados por exceso en las células del tumor correspondiente.

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

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular, el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 restos de aminoácidos y suelen contener dos restos conservados ("anclaje") en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un "motivo de unión" que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores TCR específicos.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores comprende los siguientes grupos principales:

a) Antígenos cáncer-testículo: los primeros TAA descubiertos que pueden reconocer los 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 inmunitario. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.
b) Antígenos de diferenciación: estos TAA están presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor; la mayoría se encuentran en melanomas y en melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.
c) TAA expresados en exceso: se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítopos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la expresión en exceso 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 posteriores a la traducción anormales: estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se expresan en exceso en los tumores, pese a lo cual aparecen asociadas a tumores por procesos posteriores a la traducción que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítopos nuevos en tumores como sucede con MUC1 o de fenómenos como el corte y empalme 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 de útero.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y se puedan emplear como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno se debe expresar principalmente en células tumorales y no en tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe ser en cantidades comparativamente pequeñas. En una realización preferida, el péptido debe presentarse en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo, porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de

las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas por exceso y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja y col., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido ("péptido inmunogénico") derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los procedimientos 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 expresados en exceso 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 inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras ("linfocito T efector").

En el caso de los TCR y de los anticuerpos de acuerdo con a la invención la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En los TCR y en los anticuerpos de la invención la presentación es el factor determinante.

En la siguiente descripción detallada de las proteínas originarias (polipéptidos) de los péptidos de acuerdo con la invención se desvelan diversas aplicaciones contra otros tipos de cáncer, tanto terapéuticas como diagnósticas.

La expresión en exceso de CSRP2 se asocia con la desdiferenciación del carcinoma hepatocelular (Midorikawa y col., 2002).

CYB5A codifica una enzima que detoxifica las moléculas carcinógenas y es un factor de pronóstico del cáncer de páncreas (Blanke y col., 2014; Giovannetti y col., 2014).

Los niveles de expresión aumentados de CYP27A1 se asocian con el carcinoma de endometrio, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal (Bergada y col., 2014; Nelson y col., 2013; Matusiak y Benya, 2007).

Se notificó la expresión en exceso de CYP2E1 en el cáncer colorrectal, los polimorfismos específicos se asocian con el cáncer de vejiga y pulmón y en las células de cáncer de mama (Ye y col., 2014; Patel y col., 2014; Deng y col., 2014; Leung y col., 2013).

CYP2J2 es una enzima, para la que se comprobó que se expresaba en exceso en una variedad de cánceres humanos, incluyendo el cáncer de esófago, pulmón, mama, estómago, hígado y colon (Jiang y col., 2005; Narjoz y col., 2014).

Se ha comprobado que CYP4F8 se expresaba mucho en cáncer de próstata (Vainio y col., 201 1). Se ha comprobado que CYP4F2 y CYP4F3 se expresaban en exceso en el adenocarcinoma ductal pancreático y CYP4F2 solo en cáncer de ovarios (Gandhi y col., 2013; Alexanian y col., 2012).

Se mostró que la expresión de CYP4F11 estaba regulada por NF-KB y p53 (Kalsotra y col., 2004; Bell y Strobel, 2012; Goldstein y col., 2013).

Las variantes genéticas de CYPAF12 se asocian significativamente con la respuesta a gemcitabina en pacientes con cáncer de páncreas (Goldstein y col., 2013; Harris y col., 2014).

Altos niveles de DAP3 se correlacionan por una parte con mejores respuestas a la quimioterapia en el cáncer gástrico y mejor resultado clínico en el cáncer de mama, pero por otra parte, se notificó una expresión en exceso de DAP3 en tumores oncocíticos de tiroides y glioblastoma invasivo (Jia y col., 2014; Wazir y col., 2012; Jacques y col., 2009; Mariani y col., 2001).

PEXl9 es esencial para la biogénesis de los peroxisomas, pero también mostró interactuar directamente con pl9ARF, conduciendo en última instancia a la retención de este factor en el citoplasma y a una inactivación de la función supresora del tumor p53 (Sugihara y col., 2001).

DDX11, que pertenece a la familia DEAH de las ADN helicasas, se expresa intensamente en el melanoma avanzado (Bhattacharya y col., 2012).

NME4 es una nucleósido difosfato quinasa, que se expresa en exceso en el cáncer de colon y gástrico, así como en el síndrome mielodisplásico, estando asociado en esta última enfermedad con un pronóstico malo (Kracmarova y col., 2008; Seifert y col., 2005).

DENND5B actúa como factor de intercambio de GDP-GTP para activar las Rab-GTPasas (Yoshimura y col., 2010).

Se ha comprobado que DIEXF media en la degradación no proteosómica del supresor del tumor p53 (Tao y col., 2013).

DOCK7 es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, para el que se ha comprobado que se expresa en exceso en glioblastoma y que aumenta la invasión de células de glioblastoma en respuesta a HGF activando Rac-I (Murray y col., 2014).

En líneas de células de carcinoma hepatocelular, se ha comprobado que DRG2 está regulado por defecto durante la apoptosis inducida por un fármaco quimioterapéutico, y la expresión en exceso de DRG2 inhibe la apoptosis inducida por doxorrubicina en estas células (Chen y col., 2012a).

DROSHA, una de las dos enzimas críticas en la biosíntesis del microARN, se expresa en exceso en numerosos cánceres incluyendo tumores gastrointestinales, cáncer de mama y cáncer de cuello de útero, y parece potenciar la proliferación, la formación de colonias y la migración de células tumorales (Avery-Kiejda y col., 2014; Havens y col., 2014; Zhou y col., 2013b).

Los SNP del gen DUSP14 se asocian con riesgo alterado de melanoma (Yang y col., 2014a; Liu y col., 2013b).

Un estudio de secuenciación del exoma completo descubrió mutaciones somáticas en el gen DYNClHl en pacientes con neoplasma mucinoso papilar intraductal del páncreas (Furukawa y col., 2011).

Se ha comprobado que la proteína EEF2 se expresa en exceso en el cáncer de pulmón, esófago, páncreas, mama y próstata, en glioblastoma multiforme y en linfoma no de Hodgkin y juega un papel oncogénico en el crecimiento de células cancerosas (Oji y col., 2014; Zhu y col., 2014a).

Se identificaron mutaciones en el gen de EFR3A en muestras de adenoma colorrectal (Bojjireddy y col., 2014; Zhou y col., 2013a).

EIF2B5 codifica una unidad del factor B de inicio de la traducción. Se describieron polimorfismos de nucleótido único en este gen que estaban asociados con el tiempo de supervivencia en el cáncer de ovarios (Goode y col., 2010).

EIF3A, el factor 3 de inicio de la traducción eucariota, subunidad A, se expresa en exceso en cánceres de mama, pulmón, cuello del útero, esófago, estómago y colon y se ha comprobado que está implicado en la regulación del ciclo celular (Dong y Zhang, 2006).

EIF4E es un potente oncogén elevado en hasta un 30 % de neoplasias malignas humanas, incluyendo carcinomas de mama, próstata, pulmón, cabeza, y cuello, así como en muchas leucemias y linfomas (Carroll y Borden, 2013).

Se ha comprobado que ELOVL2 se expresa en exceso en el carcinoma hepatocelular (Jakobsson y col., 2006; Zekri y col., 2012).

EPRS codifica una aminoacil-ARNt sintetasa multifuncional, para el que se notificó que era un antígeno asociado a tumor en el cáncer de colon (Line y col., 2002).

La actividad del promotor EXOSC4 está aumentada en el carcinoma hepatocelular, debido a la hipometilación del ADN. EXOSC4 inhibe eficaz y específicamente el crecimiento de células cancerosas y las capacidades invasivas de las células (Drazkowska y col., 2013; Stefanska y col., 2014).

Se ha descubierto que la enzima hidrolítica FUCA2 era esencial para la adhesión de H. pylori a las células de cáncer gástrico humano (Liu y col., 2009a).

GABRQ codifica la subunidad teta del receptor GABAA. Se ha comprobado que GABA estimula el crecimiento del carcinoma hepatocelular humano a través de la subunidad theta del receptor GABAA expresado en exceso (Li y col., 2012).

En el carcinoma escamocelular, se notificó que la expresión en exceso de GALNT2 potenció el potencial invasivo de las células tumorales modificando la O-glicosilación y la actividad de EGFR (Lin y col., 2014; Hua y col., 2012a; Wu y col., 2011).

Altos niveles de GGH se han asociado con la resistencia celular a los antifolatos, en particular metrotexato y con un pronóstico malo en el cáncer de mama invasivo y en los tumores endocrinos pulmonares (Schneider y Ryan, 2006; Shubbar y col., 2013; He y col., 2004).

GLUL se expresa en exceso en células del carcinoma de mama humano y en astrocitomas (Zhuang y col., 2011; Collins y col., 1997; Christa y col., 1994; Cadoret y col., 2002).

Se notificó que GNPAT estaba implicado en la inhibición del crecimiento y en la inducción de la apoptosis en el melanoma metastásico (Ofman y col., 2001; Qin y col., 2013).

Se han notificado deleciones en la región cromosómica de GOLGA4 en el carcinoma de cuello de útero y en la fusión del ARNm en marco de GOLGA4 con PDGFRB en neoplasias mieloproliferativas (Senchenko y col., 2003; Hidalgo-Curtis y col., 2010).

GPAM se expresa en cáncer de mama humano, que se asocia con cambios en el metabolismo celular y mejor supervivencia global (Brockmoller y col., 2012).

Se ha notificado que altos niveles de GPT en suero aumentan el riesgo de cáncer gastrointestinal y están asociados con carcinogénesis y recidiva en el carcinoma hepatocelular inducido por el virus de la hepatitis C (Kunutsor y col., 2014; Tarao y col., 1997; Tarao y col., 1999).

Se ha descubierto que GRB14 está regulado en exceso en el cáncer de mama, donde la alta expresión se asoció significativamente con mejor supervivencia global exenta de enfermedad (Huang y col., 2013; Balogh y col., 2012).

Se notificaron polimorfismos de nucleótido único en el gen GTF2H4 que aumentaban el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón relacionado con tabaquismo y cáncer de cuello de útero inducido por el virus del papiloma (Mydlikova y col., 2010; Buch y col., 2012; Wang y col., 2010).

Diferentes estudios sugieren un importante papel de HSPA2 en la progresión de la enfermedad del cáncer de cuello de útero, carcinoma de células renales y cáncer de vejiga. Los polimorfismos del gen están asociados con el desarrollo de cáncer gástrico (Singh y Suri, 2014; Ferrer-Ferrer y col., 2013; Garg y col., 2010a; Garg y col., 2010b).

Se ha comprobado que HSPA8 se expresa en exceso en el carcinoma escamocelular de esófago. Adicionalmente, HSPA8 se expresa en exceso en mieloma múltiple y carcinoma colónico y la expresión de HSPA8 inducida por BCR-ABLI promueve la supervivencia celular en leucemia mieloide crónica (Dadkhah y col., 2013; Wang y col., 2013a; Chatterjee y col., 2013; Kubota y col., 2010; Jose-Eneriz y col., 2008).

Se ha descrito que MDNI es un gen supresor tumoral candidato, mutado en cánceres de mama del tipo B luminal (Cornen y col., 2014).

Se ha notificado que MIA3, conocida también como proteína 1 de transporte y organización del aparato de Golgi (TANGO), está regulada por defecto en los carcinomas de colon y hepatocelulares, y juega un papel supresor del tumor en estas entidades (Arndt y Bosserhoff, 2007). En contraste, un estudio en el carcinoma escamocelular oral indica una asociación de la expresión de MIA3 con la progresión del tumor, formación de metástasis y estadio clínico, que apuntan hacia una oncogenicación de MIA3 (Sasahira y col., 2014).

CPSF6 se ha identificado como un gen en un "casete génico equilibrado" asociado con diferencias significativas en el potencial metastásico e invasivo de algunos tipos de tumores, tales como cáncer de mama, colon, hígado, pulmón, esófago y tiroides (Yu y col., 2008).

Se ha notificado que niveles bajos de expresión de MPDZ estaban asociados con un pronóstico malo en pacientes con cáncer de mama (Martin y col., 2004).

NAA35, conocido también como MAKIO, codifica la N(alfa)-acetiltransferasa 35, subunidad auxiliar de NatC. En pacientes con carcinoma escamocelular de esófago se descubrió un cáncer fuertemente enriquecido en ARN GOLMI-MAKIO quimérico, que codifica una proteína de fusión secretada, potencialmente útil como marcador molecular (Zhang y col., 2013b).

Se ha comprobado que NAV2 se expresa específicamente en un grupo de cánceres de colon y el tratamiento de las células de cáncer de colon con oligonucleótidos de sentido contrario para NAV2 indujo la apoptosis (Ishiguro y col., 2002).

La expresión en exceso de NCSTN es indicadora de un empeoramiento en la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama negativo para los receptores de estrógeno y se detectaron altos niveles de nicastrina y Notch4 en células de cáncer de mama resistentes a la terapia endocrina, donde su activación impulsa en última instancia un comportamiento invasivo (Sarajlic y col., 2014; Lombardo y col., 2014).

La proteína NKDI está reducida, pero el ARNm de NKDI está elevado en el cáncer de pulmón no microcítico, lo primero se correlaciona con un mayor potencial invasivo y un mal pronóstico (Zhang y col., 2011). También se ha descubierto que el ARNm de NKDI está elevado en células de tumores de colon humano (Yan y col., 2001; Zhang y col., 2011).

En cáncer de esófago, se ha notificado que NUDC está asociado con metástasis nodal, mientras que la expresión en exceso de NUDC en células de cáncer de próstata conduce a un bloqueo en la división celular (Hatakeyama y col., 2006; Lin y col., 2004).

Un estudio que investigaba el papel de la ruta de señalización de Notch en cáncer de ovarios notificó una mayor

frecuencia de la expresión de RFNG en adenoma en comparación con carcinoma (Gu y col., 2012; Hopfer y col., 2005).

RINT1 se describe como un oncogén en glioblastoma multiforme y como gen de susceptibilidad a cáncer moderadamente penetrante se observa en cáncer de mama así como en cánceres relacionados con el síndrome de Lynch (Ngeow y Eng, 2014; Quayle y col., 2012).

Se ha descubierto que una expresión elevada de RORC está asociada con una supervivencia más larga exenta de metástasis en cáncer de mama. La expresión de RORC atenuada en adenomas somatotrofos está asociada con un tamaño de tumor aumentado y una respuesta clínica debilitada al tratamiento con somatostatina (Cadenas y col., 2014; Lekva y col., 2013).

Se ha notificado que RPL17 promueve la resistencia multifármaco suprimiendo la apoptosis inducida por fármacos (Shi y col., 2004b).

Se notificó la expresión aumentada de RPS29 en cáncer gástrico y colorrectal (Takemasa y col., 2012; Sun y col., 2005).

SAMM50 codifica un componente de la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM) de la membrana externa mitocondrial, que funciona en el ensamblaje de las proteínas de barril beta en la membrana mitocondrial externa. Se detectó un ARNm quimérico promotor del crecimiento (SAMM50-PARVB) en células de cáncer de mama y ovarios y en numerosas muestras de cáncer de mama, estómago, colon, riñón y útero (Plebani y col., 2012).

SERPINF2 codifica el inhibidor mayor de la plasmina, que degrada la fibrina y otras proteínas diversas. Se ha comprobado que el nivel en plasma del complejo inhibidor de plasmina-alfa 2-plasmina era predictivo de la supervivencia en el cáncer de pulmón no microcítico y se ha observado una baja actividad de la alfa 2-antiplasmina en la sangre de los pacientes con carcinoma prostático (Zietek y col., 1996; Taguchi y col., 1996).

La expresión en exceso de SF3B3 se correlacionó significativamente con la supervivencia global y la resistencia endocrina en el cáncer de mama positivo para los receptores de estrógenos (Gokmen-Polar y col., 2014).

Los niveles de la proteína SHCI están elevados en cáncer de próstata, cáncer metastásico, cáncer de ovarios y cáncer de tiroides y se cree que las diferentes isoformas funcionan como una proteína adaptadora primaria para mediar las señales mitogénicas de los esteroides el nivel no genómico (Alam y col., 2009; Rajendran y col., 2010).

AMACR se usa como biomarcador en el cáncer de próstata, debido a que está fuertemente expresado en exceso en esta entidad (Wu y col., 2014). Adicionalmente, se usa como marcador inmunohistoquímico para el diagnóstico del carcinoma de células renales (Ross y col., 2012).

Los datos experimentales sugieren que la expresión de C1QTNF3 puede jugar un papel en el crecimiento tumoral del osteosarcoma, asociada con la activación de la ruta de señalización de ERK1/2 y esta es una novedosa asipoquina antiapoctótica que protege los citoblastos mesenquimales de la apoptosis inducida por la privación de suero hipoxial mediante la señalización de la ruta de PI3KlAkt (Hou y col., 2014; Akiyama y col., 2009).

GPC3 se expresa en la mayoría de carcinomas hepatocelulares. Se están ensayando actualmente dos enfoques terapéuticos para HCC que se dirigen a GPC3 en los ensayos clínicos en fase II: un anticuerpo monoclonal GPC3 humanizado y una vacuna que consiste en dos péptidos derivados de GPC3. Los péptidos usados en el último estudio son distintos de los péptidos presentados en el presente documento. Se ha identificado también la expresión de GPC3 en todos los tumores del saco vitelino, algunos carcinomas escamocelulares del pulmón y carcinomas de células claras del ovario (Filmus y Capurro, 2013; Kandil y Cooper, 2009).

MAGEB2 se clasifica como antígeno de cáncer de testículo, ya que se expresa en testículo y placenta, y en una fracción significativa de tumores de diversos tipos histológicos, entre otros, mieloma múltiple y carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (Pattani y col., 2012; Van y col., 2011).

MAPKAPK5 codifica un supresor tumoral y un miembro de la familia de las serinatreonina quinasa. Se ha comprobado que MAPKAPK5 se expresa por defecto en el cáncer colorrectal, lo que lleva a un aumento en la actividad de la microproteína y disminuye la formación del cáncer suprimiendo la actividad ras oncogénica en un modelo de murino de cáncer hematopoyético (Yoshizuka y col., 2012; Kress y col., 2011).

La expresión en exceso de USP14 está asociada con la proliferación creciente de células tumorales y un mal pronóstico en el cáncer del epitelio ovárico, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer colorrectal (Wang y col., 2015; Wu y col., 2013a; Shinji y col., 2006).

C4A se ha descrito como un biomarcador para el síndrome de ovarios poliquísticos y el cáncer de endometrio y los datos experimentales sugieren que C4 puede mediar en el crecimiento del cáncer (Galazis y col., 2013; Rutkowski y col., 2010).

Se ha notificado que CAPZB se expresa en exceso en carcinomas escamocelulares humanos positivos para 18

papilomavirus humanos y se ha identificado como un locus de susceptibilidad para el cáncer de próstata (Lo y col., 2007; Nwosu y col., 2001).

Los polimorfismos de nucleótido único en el gen de CFHR5 están asociados con la supervivencia exenta de eventos en el linfoma folicular (Charbonneau y col., 2012).

CLIP1 codifica el dominio CAP-GLY que contiene la proteína enlazadora 1, que une las vesículas endocíticas a los microtúbulos. Este gen está fuertemente expresado en células Reed-Sternberg de enfermedad de Hodgkin y cáncer de mama y parece estar implicado en la migración e invasión de células de cáncer de mama y cáncer de páncreas (Sun y col., 2013; Suzuki y Takahashi, 2008; Li y col., 2014a; Sun y col., 2012).

CLU puede inhibir la progresión tumoral, mientras que, en neoplasias avanzadas, puede ofrecer una ventaja de supervivencia significativa en el tumor suprimiendo muchos estresores terapéuticos y potenciando la metástasis. CLU ha mostrado jugar un papel crítico en la patogénesis del cáncer de próstata, para regular el comportamiento agresivo de las células de carcinoma de células renales claras humano mediante la modulación de la señalización de ERK112 y la expresión de MMM-9 y confiere resistencia al tratamiento en estadios avanzados de cáncer de pulmón (Trougakos, 2013; Panico y col., 2009; Takeuchi y col., 2014; Wang y col., 2014).

El gen de la fusión SEC16A-NOTCH1 se ha notificado como el primer gen de fusión recurrente en el cáncer de mama (Edwards y Howarth, 2012).

Se ha observado una deleción recurrente del gen SHQI en el cáncer de próstata y el cáncer de cuello de útero, lo que implica un papel supresor del tumor de SHQI (Krohn y col., 2013; Lando y col., 2013).

En células de carcinomas renales de células claras y cáncer de vejiga, la expresión alta de SLC16A1 se asocia con factores de pronóstico malo y predice la progresión tumoral. En cáncer colorrectal, los polimorfismos de nucleótido único en el gen SLX16A1 pueden afectar los resultados clínicos y se pueden usar para predecir la respuesta a la quimioterapia adyuvante (Kim y col., 2015; Fei y col., 2014a; Fei y col., 2014a).

Se ha comprobado que el glioblastoma libera glutamato a altos niveles, lo que puede estimular la proliferación de células tumorales y facilita la invasión del tumor y regula por defecto SLCIA2, lo que está correlacionado con un tumor de grado superior, implicando su papel potencial en la progresión de tumores gliales. Adicionalmente, en el cáncer gástrico, se ha detectado un gen de fusión de SLCIA2 con CD44 y puede representar una clase de fusiones génicas que establece un medio metabólico prooncogénico que favorece el crecimiento y la supervivencia del tumor (Tao y col., 201 1; de Groot y col., 2005).

La elevada expresión de SLC3A2 se asocia con el crecimiento del tumor, agresividad biológica y supervivencia de pacientes con cáncer del tracto biliar y contribuye significativamente a un pronóstico malo de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico mediante la promoción de la proliferación celular mediante la ruta PI3KIAkt. Adicionalmente, la expresión en exceso de SLC3A2 junto con la integrina pI, integrina p3 y Fak se asocia con la progresión y la metástasis hacia el hígado del cáncer colorrectal (Kaira y col., 2014; Fei y col., 2014b; Sun y col., 2014).

Las evidencias de la implicación de SLC9A3R1 en el desarrollo del cáncer están presentes en el carcinoma hepatocelular, schwannoma, glioblastoma, cáncer colorrectal y particularmente en el cáncer de mama (Saponaro y col., 2014).

Se ha notificado que NFYC promueve la expresión de los oncogenes en las células de cáncer gástrico y de cáncer de próstata (Zhang y col., 2014a; Gong y col., 2013).

THY1 es un gen supresor tumoral candidato en el carcinoma nasofaríngeo que soporta la actividad antiinvasiva (Lung y col., 2010).

TIMM17A se expresa en exceso en células 21T de cáncer de mama y la expresión del ARNm en tejidos de cáncer de mama está correlacionada con la progresión del tumor (Xu y col., 2010).

TMEM209 se expresa ampliamente en cáncer de pulmón (Fujitomo y col., 2012).

TNK2, conocida también como ACKI tirosina quinasa, está activada, amplificada o mutada en una amplia variedad de cánceres humanos. La quinasa desregulada es oncogénica y su activación se correlaciona con la progresión al estadio metastásico. Los inhibidores de ACKI han mostrado ser prometedores en estudios preclínicos (Mahajan y Mahajan, 2013).

TRIM55 codifica una proteína RING de dedo de cinc que se asocia transitoriamente con los microtúbulos, la miosina y la titina durante el ensamblaje del sarcómero al músculo y está también implicada en la señalización del sarcómero en el núcleo (Pizon y col., 2002).

La interferencia de ARN de la proteína Ufdl puede sensibilizar una línea de células SW1116/HCPT de cáncer de colon resistente a hidroxicamptotecina (Chen y col., 2011a; Chen y col., 201 Ic).

En el cáncer colorrectal, el gen UGT1A1 está silenciado a través de la metilación y por tanto se considera como el punto objetivo de la investigación para la resistencia al fármaco irinotecan (CPT-11) y los mecanismos de control para la reversión de la resistencia a los fármacos (Xie y col., 2014).

UGT1A10 se expresa en tejido gástrico y biliar (Strassburg y col., 1997) y su expresión en exceso aumenta significativamente la toxicidad del agente antitumoral 5-dimetilaminopropilamino-8-hidroxitriazoloacridinona C-1305 (Pawlowska y col., 2013). Además, UGT1A10 cataliza la glucuronidación de los xenobióticos, mutágenos, y metabolitos reactivos y actúa por tanto como antioxidante indirecto. Se detectaron elementos de respuesta xenobióticos (XRE) y antioxidantes (ARE) en los promotores de UGT1A8, UGT1A9, y UGT1A10 (Kalthoff y col., 2010).

UGT1A8 se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal (Gregory y col., 2003) y la expresión del ARNm está regulada en exceso tras el tratamiento con el agente quimiopreventivo sulforafano (SFN) (Wang y col., 2012).

Se asocia el haplotipo UGT1A7 con un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular en portadores de hepatitis B (Kong y col., 2008).

UGT1A6 se expresa en exceso en las células de cáncer de mama resistentes a metotrexato (de Almagro y col., 2011) y está inducida por p-Naftoflavona, un presunto agente quimioprotector (Hanioka y col., 2012).

UGT1A9 se expresa principalmente en hígado y riñones (Gregory y col., 2003). Los polimorfismos de la línea germinal UGTIA9 son potenciales predictores de recidiva en cáncer de próstata tras prostatectomía (Laverdiere y col., 2014).

El promotor UGT1A4 y los polimorfismos de la región de codificación conducen a una variabilidad en la glucoronidación de anastrozol, un inhibidor de la aromatasa en pacientes con cáncer de mama (Edavana y col., 2013).

UPF1 es parte de la maquinaria de degradación mediada por el ARNm sin sentido (NMD) y puede tener un papel funcional en la progresión y la metástasis del cáncer de próstata (Yang y col., 2013). Además, el gen UPFI de supervivencia del ARN está comúnmente mutado en el carcinoma adenoescamoso de páncreas (Liu y col., 2014).

UQCRB es una subunidad del complejo III de la mitocondria 1. la inhibición de UQCRB en células tumorales suprime la angiogénesis tumoral inducida por hipoxia (Jung y col., 2013). Dos SNP en la región 3' no traducida de UQCRB son marcadores pronósticos candidatos del cáncer colorrectal (Lascorz y col., 2012).

Las alteraciones del número de copias de USO1 están correlacionadas con la expresión génica diferencial en el melanoma de diseminación superficial en comparación con el melanoma nodular (Rose y col., 2011).

Se detectaron reducciones significativas en la expresión de las proteínas USP10 y SIRT6 en cánceres de colon humano (Lin y col., 2013).

UTP18 altera también la traducción para promover la resistencia al estrés y el crecimiento, y está frecuentemente aumentado y expresado en exceso en cáncer (Yang y col., 2014b).

El polimorfismo VARS rs2074511 está asociado con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama de tipo triple negativo y por tanto puede considerarse como un factor de pronóstico para la supervivencia en pacientes con cáncer de mama temprano (Chae y col., 2011).

VMP1, una proteína asociada a autofagia inducida por estrés, está también inducida por el oncogén KRAS (Lo Re y col., 2012). VPM1 se expresa en exceso en cáncer de páncreas humano poco diferenciado como respuesta a fármacos quimioterapéuticos (Gilabert y col., 2013). Se ha descubierto una regulación por defecto significativa de VMP1 en tejidos de HCC humanos y estrechamente correlacionada con nódulos tumorales múltiples, ausencia de formación capsular, invasión venosa y pronóstico malo de HCC (Guo y col., 2012).

WDR26 protege las células miocárdicas contra el estrés oxidativo (Feng y col., 2012).

ZC3H7A forma parte de la familia de proteínas de dedo de cinc CCCH conocida como reguladores de la activación de macrófagos (Liang y col., 2008). Se ha descubierto que ZC3H7A tenía mayores frecuencias alélicas de mutaciones funcionales en el tumor metastásico del adenocarcinoma ductal pancreático (Zhou y col., 2012).

FASN es una sintasa de ácido graso y está implicada en la síntesis lipídica potenciada en diferentes tipos de cánceres, incluyendo cáncer de mama, páncreas, próstata, hígado, ovarios, colon y de endometrio (Wu y col., 2014; Zhao y col., 2013).

FGG está regulado en exceso en el carcinoma hepatocelular así como en los cánceres de próstata, pulmón y mama (Vejda y col., 2002; Zhu y col., 2009).

FMO5 es una monooxigenasa que es FMO dominante específica de hígado, y está regulada en exceso en los tumores de mama positivos para el receptor alfa del estrógeno (Bieche y col., 2004; Zhang y Cashman, 2006).

El ARNm de HADHA se reduce con la progresión de la desdiferenciación en HCC (Tanaka y col., 2013) y en tumores

de mama negativos para el receptor alfa del estrógeno (Mamtani y Kulkarni, 2012).

La variación genética en el gen HAL puede jugar un papel en el desarrollo del cáncer de piel (Welsh y col., 2008).

HLTF es un miembro de la familia SWIISNF de reguladores de la transcripción con actividad ligasa de la helicasa y la ubiquitina E3 y se ha descubierto que se inactiva mediante hipermetilación en tumores de colon, gástricos, de útero, de vejiga y de pulmón (Debauve y col., 2008; Castro y col., 2010; Garcia-Baquero y col., 2014).

HDAC10 es una histona desacetilasa y un regulador de la transcripción. La expresión de HDAC10 estaba significativamente disminuida en tejidos de cáncer gástrico en comparación con tejidos adyacentes (Jin y col., 2014). HDAC10 está inversamente relacionada con metástasis de ganglios linfáticos en pacientes humanos en carcinoma escamocelular de cuello de útero (Song y col., 2013). HDAC10 está hipermetilada en tumores adenocorticales malignos (Fonseca y col., 2012). Los niveles de HDAC10 están aumentados en leucemia linfocítica crónica (Wang y col., 2011). El polimorfismo del promotor HDAC10-589C>T está significativamente asociado con la incidencia de HCC entre pacientes crónicos de VHB así como la aceleración de HCC entre pacientes crónicos de VHB (Park y col., 2007). La expresión reducida de los genes de la histona desacetilasa de clase II se asocia con un pronóstico malo en pacientes con cáncer de pulmón (Osada y col., 2004).

La expresión baja de HIPIR se asocia fuertemente con un mal resultado en los pacientes con linfoma de linfocitos B grandes difusos (Wong y col., 2014).

HM13 es una peptidasa del péptido de señalización y afecta la viabilidad celular en el adenoma colorrectal (Sillars-Hardebol y col., 2012).

Los niveles de HPR en suero en pacientes con linfoma maligno fueron significativamente mayores que en los grupos del control sin enfermedad y la expresión de HPR aumentó con el progreso de la enfermedad (Epelbaum y col., 1998). La expresión de HPR aumentó en paralelo el potencial maligno en cánceres de mama y los cánceres de mama positivos para HPR son más propensos a reaparecer después de la resección primaria y están asociados con intervalos exentos de enfermedad más cortos (Shurbaji y col., 1991). Una variante (rs932335) del gen HSD11B1 se asocia con cáncer colorrectal y cáncer de mama (Feigelson y col., 2008; Wang y col., 2013b).

La expresión de HSD17B6 en tejidos de pacientes con cáncer de próstata sometidos a terapia de privación de andrógenos (ADT) fue significativamente mayor que en tejidos de individuos no tratados (Ishizaki y col., 2013).

HSPE1 es una chaperonina de la mitocondria 1 que funciona en el plegado de la proteína y la señalización celular (señalización de NF-kappaB y WNT). Se han descubierto niveles crecientes de Hsp10 en células tumorales del cáncer de intestino grueso, cáncer de cuello de útero externo, cáncer de próstata, linfoma de células del manto y cáncer de ovarios seroso. En la carcinogénesis de los bronquios, se han notificado niveles disminuidos de Hsp 10 (David y col., 2013).

Xenoinjertos de carcinoma de ovarios transplantados en los flancos de ratones alotímicos y tratados con paclitaxel mostraron una expresión de ID11 disminuida en comparación con el xenoinjerto sin tratar (Bani y col., 2004).

IGFBPL1 es un regulador de los factores de crecimiento de la insulina y está regulado por defecto en líneas de células de cáncer de mama mediante hipermetilación anómala. La metilación en IGFBPL1 se ha asociado claramente con el empeoramiento en la supervivencia global y la supervivencia exenta de enfermedad (Smith y col., 2007).

La proteína IKBKAP asociada a microsomas sensibles a andrógenos moduló la expresión de los marcadores epiteliales y neuronales de próstata, atenuó la proliferación mediante un mecanismo dependiente de los receptores de andrógenos, y reguló simultáneamente la transcripción mediada por receptores de andrógenos en las células LNCaP de adenocarcinoma de próstata (Martinez y col., 2011).

INTS8 forma parte de un panel de marcadores que discrimina los carcinomas gástricos de los tejidos no cancerosos adyacentes (Cheng y col., 2013).

Se presentó un péptido pIRS-21097-1105 derivado de IRS2 en melanomas HLA-A2(+) y carcinomas de mama, de ovarios, y colorrectales (Zarling y col., 2014). El genotipo de IRS-2 1057 DD y el alelo D se han asociado significativamente con riesgo de HCC (Rashad y col., 2014).

ITGA7 es la cadena alfa del dímero del receptor de la laminina I de la integrina alfa-7Ibeta-1. ITGA7 es un gen supresor tumoral que es crítico para suprimir el crecimiento de los tumores malignos. El análisis mutacional desveló mutaciones *ITGA7* en el cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, leiomiosarcoma de tejido blando y glioblastoma multiforme. ITGA7 está regulado por defecto en el cáncer de próstata no metastásico y en leiomiosarcoma (Tan y col., 2013).

ITIH4 está regulado por defecto en algunos tejidos tumorales incluyendo colon, estómago, ovario, pulmón, riñón, recto y próstata (Hamm y col., 2008). Niveles bajos en suero de ITIH4 están asociados con una supervivencia más corta en pacientes de HCC asociada a VHB (Noh y col., 2014). Se observaron concentraciones de ITIH4 en suero significativamente aumentadas en cáncer de mama y los niveles de ITIH4 en suero estaban significativamente disminuidos tras la cirugía (van, I y col., 2010).

Se identificó una mutación de sentido incorrecto en SHKBPI, que actúa en la dirección 3' de FLT3, un receptor de la tirosina quinasa mutado en aproximadamente un 30 % de casos de LMA (Greif y col., 201 1). SHKBPI es uno de los diversos candidatos potenciales de biomarcadores de proteínas para clasificar tumores neuroendocrinos de intestino delgado bien diferenciados (WD-SI-NETS) en un diferente estadio de la enfermedad (Darmanis y col., 2013).

La expresión de KLB está elevada en tejidos de HCC en comparación con tejidos tumorales no coincidentes (Poh y col., 2012).

El polimorfismo rs2232596 de LBP está asociado con un riesgo significativamente aumentado de carcinoma colorrectal en chinos de la etnia Han (Chen y col., 2011 b). LBP es un biomarcador sérico candidato del carcinoma de ovarios (Boylan y col., 2010). LBP se redujo significativamente tras el tratamiento con quimioterapia en pacientes con carcinoma de pulmón microcítico (Staal-van den Brekel AJ y col., 1997).

La expresión del ARNm de LBR se asocia directamente con el grado del tumor y el índice de pronóstico de Nottingham en el cáncer de mama (Wazir y col., 2013). LBR está fuertemente expresado en células de carcinoma de tiroides papilar, pero un plegado anómalo de la proteína puede explicar su carencia de reactividad inmunohistoquímica y está asociado con un plegado anómalo de la membrana nuclear (Recupero y col., 2010).

Se ha notificado la desregulación de LEPR en una variedad de células malignas incluyendo cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Ntikoudi y col., 2014; Surmacz, 2013; Uddin y col., 2011).

Los polimorfismos de nucleótido único LIG1 están asociados con el riesgo de cáncer de pulmón, cáncer de endometrio y glioma (Doherty y col., 2011; Lee y col., 2008; Liu y col., 2009b).

La expresión de LRPPRC en tejidos de cáncer gástrico es significativamente mayor que en tejido del control emparejado (Li y col., 2014b). Los niveles de LRPPRC sirven como marcador pronóstico de pacientes con adenocarcinomas de próstata (PCA), y pacientes con altos niveles de LRPPRC sobreviven un periodo más corto tras cirugía que aquellos con bajos niveles de LRPPRC (Jiang y col., 2014). LRPPRC se expresa abundantemente en diversos tipos de tumores, tales como adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamocelular de esófago, estómago, colon, mama y endometrio, y linfoma (Tian y col., 2012).

La expresión de MANEA está regulada por andrógenos en células de cáncer de próstata (Romanuik y col., 2009).

OPLAH se expresa en tejidos normales de pulmón, mama, riñón, colon y ovario y tejidos tumorales y los niveles de OPLAH son significativamente superiores en especímenes normales que en tumores de pacientes individuales (Srivenugopal y Ali-Osman, 1997).

Las glicoformas de ORM2 proporcionan información valiosa para diferenciar entre el cáncer de hígado primario y secundario (Mackiewicz y Mackiewicz, 1995). Se ha confirmó que los niveles de ORM2 en plasma están significativamente elevados en pacientes que padecían carcinoma colorrectal en comparación con los controles (Zhang y col., 2012). Los niveles de la glicoforma fucosilada de ORM2 fueron significativamente mayores en los casos de cáncer por adenocarcinoma de pulmón en comparación con los controles (Ahn y col., 2014). ORM2 es uno de los posibles biomarcadores para el diagnóstico temprano del colangiocarcinoma (Rucksaken y col., 2012).

Los niveles de tetrahidrobiopterina aumentados dan como resultado una potenciación de la actividad de PAH y de la proteína PAH en células de hepatoma humano (McGuire, 1991).

PARP14 se expresa intensamente en células de mieloma en plasma y está asociado con la progresión de la enfermedad y una supervivencia mala. PARP14 está críticamente implicado en la supervivencia dependiente de JNK2. Se ha descubierto que PARP14 promovía la supervivencia de las células de mieloma uniendo e inhibiendo JNKI (Barbarulo y col., 2013).

Los niveles de PC están elevados en tumores hepáticos y cáncer de pulmón (Chang y Morris, 1973; Fan y col., 2009).

Se han descrito niveles de PCNT aumentados y anomalías centrosómicas en una variedad de neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, incluyendo LMA, LMC, linfoma de células del manto, cáncer de mama y cáncer de próstata (Delaval y Doxsey, 2010).

PIGN es un gen supresor de la inestabilidad cromosómica cancerosa (CIN) que está sujeto a una pérdida frecuente del número de copias en el cáncer colorrectal CIN(+) (Burrell y col., 2013).

La expresión de PIPOX varía de acuerdo con el subtipo de cáncer de mama, donde los tumores de tipo HER-2 muestran una expresión elevada y un subtipo de cáncer de mama triple negativo muestra una expresión disminuida. La negatividad tumoral de PIPOX se asoció con una supervivencia exenta de enfermedad más corta (Yoon y col., 2014). PIPOX está reducido en tumores de próstata y reduce el potencial oncogénico de las células de próstata metabolizando la sarcosina (Khan y col., 2013). Se detectaron niveles de PSMD4 aumentados en el cáncer de colon, mieloma y carcinoma hepatocelular (Arlt y col., 2009; Midorikawa y col., 2002; Shaughnessy, Jr. y col., 2011).

PLIN2 está significativamente aumentado en pacientes con carcinoma de células claras y carcinoma papilar de células renales en comparación con los controles. Las concentraciones urinarias prequirúrgicas de PLIN2 reflejan el tamaño y el estadio del tumor (Morrissey y col., 2014). La expresión de PLIN2 es significativamente mayor en especímenes de adenocarcinoma de pulmón que en tejidos normales y carcinomas escamocelulares de pulmón (Zhang y col., 2014b).

PLK4 experimenta frecuentemente reordenamientos o pérdidas en cánceres humanos, a una velocidad particularmente elevada en carcinomas hepatocelulares, pero también en cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello (Swallow y col., 2005). PLK4 se expresa en exceso en cáncer de mama (Marina y Saavedra, 2014).

QARS es un miembro de las aminoacil-ARNt sintetasas (ARS) y carga los ARNt con glutamina. La expresión de ARS y los polimorfismos están asociados con el cáncer de mama y el glioblastoma (He y col., 2014b; Kim y col., 2012).

El gen PMFI metilado es un biomarcador diagnóstico y pronóstico para pacientes con cáncer de vejiga (Kandimalla y col., 2013).

PON2 regula en exceso algunos tumores humanos y neoplasias hematológicas malignas, incluyendo las glándulas tiroideas, próstata, páncreas, testículo, endometrio/útero, cáncer de hígado y riñón, tejidos linfoides, tumores de la vejiga urinaria, LLA y LMC y la mencionada expresión en exceso proporcionan resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos (imatinib, doxorrubicina, estaurosporina, o actinomicina) (Witte y col., 2011).

PRKAR2A es una subunidad reguladora de la proteína quinasa A. PRKAR2A aumentó notablemente la supervivencia de las líneas de células de cáncer de próstata tratadas con Taxol y Taxotere (Zynda y col., 2014). PRKAR2A está expresado en exceso en adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori y col., 2013). PRPF6 es un miembro del complejo del ayustosoma tri-snRNP (ribonucleoproteína pequeña) que impulsa la proliferación del cáncer de colon mediante corte y empalme preferente de los genes asociados con la regulación del crecimiento (Adler y col., 2014). PRPF6 está expresado en exceso en adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori y col., 2013).

PSMC4 está regulado en exceso significativa y coherentemente en células de carcinoma de próstata en comparación con el tejido de próstata normal adyacente correspondiente (Hellwinkel y col., 2011).

La expresión de QPRT aumenta con la neoplasia maligna en el glioma y, en los glioblastomas recurrentes tras la radioquimioterapia, la expresión de QPRT está asociada con un pronóstico malo (Sahm y col., 2013). QPRT es un marcador potencial para el cribado inmunohistoquímico de los nódulos tiroideos foliculares (Hinsch y col., 2009).

RABGGTB está expresado en exceso en el linfoma de linfocitos B grandes difusos refractarios a quimioterapia (Linderoth y col., 2008).

RAD21 está expresado en exceso en tumores gastrointestinales, carcinoma colorrectal, cáncer de endometrio avanzado, cáncer de próstata y cáncer de mama (Atienza y col., 2005; Deb y col., 2014; Porkka y col., 2004; Supernat y col., 2012; Xu y col., 2014).

RAD23B tiene un papel potencial en la progresión del cáncer de mama (Linge y col., 2014). El polimorfismo de nucleótido único RAD23B rs 1805329 se asoció significativamente con el desarrollo y la recidiva de HCC en pacientes japoneses con VHC (Tomoda y col., 2012).

RASAL2 es una proteína activadora de la RAS-GTPasa con funciones supresoras del tumor en cáncer de mama positivo a los receptores de estrógenos, cáncer de ovarios y cáncer de pulmón (Li y Li, 2014; Huang y col., 2014). En contraste, RASAL2 es oncogénico en el cáncer de mama triple negativo e impulsa la invasión y la metástasis del mesénquima (Feng y col., 2014a). El agotamiento de RNMT inhibe eficaz y específicamente el crecimiento de células cancerosas y las capacidades invasivas de las células en diferentes tipos de cánceres, incluyendo cáncer de hígado (Stefanska y col., 2014).

Se han notificado la expresión en exceso de ROCK1 o las mutaciones en el gen ROCK1 que producen una elevada actividad quinasa para diversos cánceres, incluyendo cáncer de pulmón, carcinoma gástrico, LMC y LMA (Rath y Olson, 2012).

RPLIOA es un gen dirigido a c-Myc y puede contribuir a la transformación de los hepatocitos (Hunecke y col., 2012).

Los puntos de interrupción Inv(3) y t(3;3), que se asocian particularmente con un pronóstico malo en la leucemia mieloide o la mielodisplasia, se agrupan en una región que está localizada centroméricamente y en la dirección 3' del gen RPNI (Wieser, 2002).

RRBP1 está expresada en exceso en cáncer de pulmón y cáncer de mama (Telikicherla y col., 2012; Tsai y col., 2013).

La expresión de SCFD1 está aumentada en la gastritis erosiva, que está vinculada al carcinoma gástrico (Galamb y col., 2008).

ABCB1 codifica la glicoproteína P (P-gp) que se expresa en células normales de diversos órganos tales como intestino,

hígado, riñón, cerebro y placenta. Se ha detectado la expresión en exceso de P-gp y polimorfismos genéticos en el carcinoma colorrectal, tumores derivados de la glándula adrenal, cáncer de pulmón y LLA (Zhang y col., 2013a; Fojo y col., 1987; Gervasini y col., 2006; Jamroziak y col., 2004).

ABCB10 codifica un transportador de ABC de la subfamilia B (MDRITAP). Se ha comprobado que ABCB10 está implicado en la resistencia a cisplatino en células KCP-4 de carcinoma epidermoide humano (Oiso y col., 2014).

Se ha comprobado que la expresión de ABCB11 está regulada en exceso en el adenocarcinoma ductal de páncreas, uno de los cánceres más resistentes a fármacos. Por tanto, esto puede contribuir a la respuesta al tratamiento generalmente mala de este cáncer (Mohelnikova-Duchonova y col., 2013).

La expresión regulada en exceso de ABCC2 en carcinomas primarios de trompas de falopio está asociada con un pronóstico malo (Halon y col., 2013).

ABCC6 está regulado por defecto en el cáncer colorrectal de no respondedores a quimioterapia paliativa (Hlavata y col., 2012). En contraste, está regulada por defecto en células A549 de NSCLC resistentes a gemcitabina (Ikeda y col., 2011).

Se ha comprobado que la expresión de ACACA está regulada en exceso en numerosos cánceres humanos, tales como carcinoma de mama, de próstata y de hígado y está correlacionada con la lipogénesis potenciada de células cancerosas. Los diversos inhibidores de ACACA mostraron un efecto terapéutico en el tratamiento de líneas de células cancerosas mediante la supresión de la proliferación celular y la inducción de la muerte celular mediante la apoptosis (Zu y col., 2013).

ACLY se expresa de forma anómala en diversos tumores, tales como carcinoma de mama, hígado, colon, pulmón y próstata, y está correlacionado inversamente con el estadio y la diferenciación tumoral (Zu y col., 2012).

ACSL3 se expresa en exceso en cáncer de pulmón y, basándose en la investigación preclínica, es una diana terapéutica nueva prometedora en el cáncer de pulmón (Pei y col., 2013). La expresión regulada en exceso de ACSL3 puede servir como potencial biomarcador del riesgo de cáncer de mama específico de receptores de estrógeno (Wang y col., 2013c).

ACSL4 se expresa en exceso en los tumores de mama negativos para los receptores de estrógeno y los tumores de mama y próstata negativos para los receptores de andrógenos. La pérdida de sensibilidad de las hormonas esteroides se asocia con la inducción de la expresión ACSL4 (Monaco y col., 2010). Se ha comprobado que el inicio de la regulación en exceso de ACSL4 se produce durante la transformación de adenoma a adenocarcinoma (Cao y col., 2001).

Se ha descubierto que la metilación de ACSS3 estaba asociada con al menos uno de los factores de riesgo clásicos, concretamente la edad, el estadio o el estado del MYCN en el neuroblastoma (Decock y col., 2012).

Se ha observado frecuentemente la delección de ADSSLI en adecocarcinomas primarios de pulmón en ratones inducidos por carcinógenos, líneas de células de adenocarcinomas de pulmón en ratón y ser humano y asociadas con un fenotipo extenso de inestabilidad cromosómica en tumores primarios de pulmón en ratones (Miller y col., 2009).

Se ha identificó AGFG2 como uno de los 14 genes candidatos pronósticos para la identificación de casos en cánceres de mama negativos al receptor de hormonas o cánceres de mama triple negativos que siguen estando exentos de recidiva metastásica (Yau y col., 2010).

AGT es un factor antiangiogénico muy potente, para el que se ha comprobado que ejerce efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Bouquet y col., 2006). En ratones transgénicos, se ha comprobado que la expresión en exceso de AGT humano disminuía la angiogénesis y por tanto retrasaba la progresión tumoral del hepatocarcinoma (Vincent y col., 2009).

AKRIC4 codifica el miembro C4 de la familia 1 de la aldo-ceto reductasa humana y cataliza la reducción del retinaldehído a retinol (Ruiz y col., 201 1). Por consiguiente, el agotamiento del retinaldehído regula por defecto la biosíntesis del ácido retinoico y está seguida por el bloqueo de la señalización retinoide, que favorece la progresión tumoral (Tang y Gudas, 2011; Ruiz y col., 2012)

Se ha comprobado que la expresión de ALDH1L1 está regulada por defecto en HCC y gliomas. La regulación por defecto de ALDH1L1 en dichos cánceres se asocia con un pronóstico más malo y un fenotipo más agresivo (Rodriguez y col., 2008; Chen y col., 2012b)

Se ha comprobado que la expresión de ALG3 está potenciada en el carcinoma escamocelular de esófago y en el cáncer de cuello de útero (Shi y col., 2014; Choi y col., 2007). En el carcinoma escamocelular de esófago, la expresión aumentada de AJG3 está correlacionada con metástasis de los ganglios linfáticos (Shi y col., 2014).

Se ha identificado ANKSIA como una novedosa diana de la familia de las quinasas Src conocidas por estar implicadas en el desarrollo de algunos cánceres colorrectales (Emaduddin y col., 2008).

APOA1 codifica la apolipoproteína A-1, el componente de la proteína mayor de la lipoproteína de alta densidad (HDL) en plasma. En modelos animales de tumores múltiples, APOA1 mostró un potente papel inmunomodulador en la tumorigénesis y se ha comprobado que suprime el crecimiento y la metástasis tumoral soportando procesos innatos e inmunoadaptativos (Zamanian-Daryoush y col., 2013).

Se ha comprobado que APOA2 disminuye significativamente en pacientes de cáncer de páncreas (Honda y col., 2012). En contraste, la expresión aumentada de APOA2 se asocia con HCC (Liu y col., 2007).

En HCC relacionado con VHB negativo para la fetoproteína alfa, se ha descubierto que APOB era una de las 14 proteínas expresadas diferencialmente que podrían asociarse con la progresión de HCC (He y col., 2014a). En cáncer de mama avanzado, se ha descubierto que APOB era una de las seis proteínas expresadas diferencialmente que podrían predecir la sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante y la supervivencia exenta de recidiva de los pacientes (Hyung y col., 2011).

En pacientes de cáncer colorrectal en estadio III y en células de melanoma humano, AQP9 se asocia con una mayor quimiorresistencia (Dou y col., 2013; Gao y col., 2012).

Se ha comprobado que ARG1 es un marcador sensible y específico para distinguir HCC de otros tumores metastásicos en el hígado (Sang y col., 2013). ARG1 puede contribuir a la inmunosupresión local en NSCLC (Rotondo y col., 2009).

Se ha descubierto que la forma fosforilada y por tanto más activa de la proteína ARSB estaba aumentada en los leucocitos periféricos de pacientes con leucemia mielógena crónica en comparación con donantes sanos (Uehara y col., 1983).

En células de cáncer de ovarios, se ha comprobado que la regulación por defecto de ASNAI aumenta la sensibilidad de la quimioterapia a los fármacos cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y arsenito (Hemmingsson y col., 2009).

Se ha comprobado que ASPH se expresaba en exceso en diversos cánceres y líneas de células cancerosas (Yang y col., 2010). La inmunización con células dendríticas cargadas con ASPH generó citotoxicidad contra células de colangiocarcinoma *in vitro* y suprimió significativamente el crecimiento y la metástasis del tumor intrahepático (Noda y col., 2012).

Se ha descubierto ATP1A2 entre 31 proteínas que estaban reguladas en exceso significativamente en glioblastoma (Com y col., 2012). En contraste, se ha comprobado que ATP1A2 está regulado por defecto en neuroblastomas metastásicos infiltrados en médula ósea (Morandi y col., 2012).

Se ha descubierto ATP1A3 entre 31 proteínas, que estaban reguladas en exceso significativamente en glioblastoma (Com y col., 2012).

ATP6V1 C1 puede promover el crecimiento del cáncer de mama y la metástasis ósea mediante la regulación de la actividad lisosómica de la VATPasa. La inactivación de ATP6V1 C1 inhibió significativamente el crecimiento, la metástasis, y las lesiones osteolíticas tumorales *in vivo* del xenoinjerto de células 4T1 de tumor de mama en ratón (Feng y col., 2013). Se ha comprobado que ATP6VlC1 se expresa en exceso en carcinoma escamocelular oral y se asoció con la movilidad de las células tumorales (Otero-Rey y col., 2008).

ATP7B se asocia con la resistencia del cáncer a cisplatino, el fármaco anticanceroso ampliamente usado (Dmitriev, 2011).

AXIN2 codifica la proteína 2 relacionada con axina (inhibición del eje), que presuntamente juega un importante papel en la regulación de la estabilidad de la beta-catenina en la ruta de señalización de Wnt (Salahshor y Woodgett, 2005). Adicionalmente, se ha comprobado que AXIN2 reprimía la expresión del oncogen c-MYC (Rennoll y col., 2014).

En HCC, la expresión baja de BAAT se asocia con una supervivencia peor en comparación con los pacientes con una expresión mayor de BAAT (Furutani y col., 1996).

Se ha comprobado la fuerte disminución de los transcritos de BHMT y BHMT2 en células HepG2 y en muestras de HCC en comparación con el tejido normal de hígado (Pellanda y col., 2012).

Se ha comprobado que C12orf44 es esencial para la autofagia e interactuar con ULKI de una manera dependiente de Atgl3 (Mercer y col., 2009). La autofagia tiene un doble papel en el cáncer, actuando como un supresor tumoral evitando la acumulación de proteínas y orgánulos dañados y como un mecanismo de supervivencia celular que puede promover el crecimiento de tumores establecidos (Yang y col., 2011 b).

C17orf70 es un componente del complejo nuclear de la anemia Fanconi y es esencial para la estabilidad del complejo. El complejo nuclear de la anemia Fanconi juega un papel central en la red de respuesta al daño del ADN. La respuesta al daño del ADN mediada por el complejo nuclear de la anemia Fanconi implica productos génicos de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2 (Ling y col., 2007).

C19orf80 codifica el gen TD26 asociado al carcinoma hepatocelular y se ha comprobado que es uno de los 5 loci con

niveles de metilación más elevados en HCC y más bajos en el tejido del control (Ammerpohl y col., 2012).

Se ha descubierto que CCT7 forma parte de una subred de proteínas, que es significativamente discriminativa del estadio final del cáncer colorrectal humano (Nibbe y col., 2009).

Se ha comprobado que CDK6 regula la actividad de la proteína Rb supresora de tumores. CDK6 puede ejercer su función promotora de tumores potenciando la proliferación y estimulando la angiogénesis (Kollmann y col., 201 3). Se ha comprobado que la inhibición farmacológica de CDK6 inhibe la diferenciación del crecimiento de células leucémicas anómalas (Placke y col., 2014).

CFH puede jugar un papel en la progresión del carcinoma espinocelular (Riihila y col., 2014). CFH puede jugar un papel clave en la resistencia a la lisis mediada por el complemento de diversas células cancerosas y se ha comprobado que está expresado en exceso en NSCLC, lo que se asocia con un pronóstico más malo (Cui y col., 2011).

Se ha descubierto una mutación inactivante de CLPTMI en células de cáncer de próstata (Rossi y col., 2005).

CMAS codifica el monofosfato de citidina de la ácido N-acetilneuramínico sintetasa, que cataliza la activación del ácido siálico y su transformación en un diéster de monofosfato de citidina. El ácido siálico activado se usa para la N-glicosilación, una modificación posterior a la traducción común durante la diferenciación celular. La expresión aumentada de los azúcares del ácido siálico sobre la superficie de células cancerosas es una de las características tumorales bien conocidas (Bull y col., 2014).

TF (transferrina es uno de los ligandos dirigidos a tumores usados más ampliamente, ya que los receptores de TF (TFR) están expresados en exceso en células malignas y juegan un papel clave en la captación del hierro celular a través de la interacción con TF (Biswas y col., 2013). Se ha sugerido que el nivel de expresión de los TFR está correlacionado con el estadio del tumor o la progresión del cáncer (Tortorella y Karagiannis, 2014).

TH1 L puede jugar un papel importante en la regulación de la proliferación e invasión en cáncer de mama humano, y podría ser una diana potencial para el tratamiento del cáncer de mama humano (Zou y col., 2010).

La hidrólisis de THTPA puede ser responsable de los efectos antiproliferativos de Ndrg-1. Se ha comprobado que Ndrg-1 reduce la invasión y la metástasis del cáncer de mama, colon, próstata y páncreas (Kovacevic y col., 2008).

SMYD3 promueve la invasión del cáncer por la regulación en exceso epigenética de la metaloproteinasa MMP-9 (Medjkane y col., 2012). La expresión de SMYD3 es indetectable o muy débil en muchos tipos de tejido normal humano, mientras que la expresión en exceso de SMYD3 se ha vinculado con el desarrollo y la progresión de los cánceres gástrico, colorrectal, hepatocelular, de próstata y de mama (Hamamoto y col., 2006; Liu y col., 2014; Liu y col., 2013a).

Se ha observado una relación entre STAT2 y la tumorigénesis en ratones transgénicos que carecían de STAT2 (Yue y col., 2015) o que expresaban constitutivamente IFN-a en el cerebro (Wang y col., 2003).

TACC3 está expresado en exceso en muchos cánceres humanos, incluyendo cáncer de ovarios, cáncer de mama, carcinoma escamocelular y linfoma (Ma y col., 2003; Jacquemier y col., 2005; Lauffart y col., 2005).

También se ha comprobado que SPBP reprime la actividad de transcripción del receptor de estrógenos a (ERa). La expresión en exceso de SPBP inhibe la proliferación de una línea de células de cáncer de mama dependiente de ERa (Gburcik y col., 2005). En el núcleo de la célula, SPBP presenta una movilidad relativamente baja y está enriquecido en regiones densas de cromatina, lo que indica claramente que es una proteína de unión a cromatina (Darvekar y col., 2012). TCF20 es importante para la inducción potenciada de proteínas implicadas en el programa de defensa celular frente al estrés oxidativo (Darvekar y col., 2014).

C3 es un elemento destacado del microentorno tumoral inflamatorio (Rutkowski y col., 2010) y la activación puede proporcionar una ventaja al crecimiento tumoral (Markiewski y col., 2008). La escisión enzimática de C3 conduce a la producción de la anafilatoxina C3a, un mediador y quimioatractor inflamatorio, y C3b (Sahu y col., 1998).

CLN3 es un gen antiapoptótico en las células NT2 precursoras neuronales y unos pocos tipos de cánceres (Zhu y col., 2014b). Está implicado en el tráfico y la regulación intracelular en células neuronales y no neuronales (Rakheja y col., 2008; Getty y Pearce, 2011) y está implicado en varias rutas de señalización importantes (Persaud-Sawin y col., 2002). El ARNm de CLN3 y la proteína se expresan en exceso en numerosas líneas de células cancerosas que incluyen mama, colon, melanoma maligno, próstata, ovarios, neuroblastoma, y glioblastoma multiforme, pero no en líneas de células cancerosas de pulmón o páncreas (Rylova y col., 2002).

SLC13A5 es uno de los 7 genes marcadores de CIMP. El CIMP (fenotipo metilador de islas CPG) de células de carcinomas renales de células claras (ccRCC) se caracteriza por la acumulación de la metilación del ADN en las islas CPG) y resultados peores en el paciente (Tian y col., 2014; Arai y col., 2012).

SLC35B2 está implicado en la regulación de la transcripción coordinada durante la inducción de la biosíntesis de sialil sulfo-Lex glicano durante la inflamación aguda (Huopaniemi y col., 2004) y en la sulfatación del epítopo de la 6-

sulfolactosamina en una línea de células de carcinoma colorrectal humano (Kamiyama y col., 2006). Las líneas de células de carcinoma colorrectal así como los tejidos colorrectales humanos expresan SLC35B2 (Kamiyama y col., 2011).

La expresión de PLOD1 se asocia con la progresión del cáncer de mama humano (Gilkes y col., 2013).

PRDX5 está regulado en exceso en muchos tumores malignos (Urig y Becker, 2006) y la inhibición de PRDX5 podría evitar el inicio y la progresión del tumor, sugiriendo que PRDX5 es una diana prometedora para la terapia contra el cáncer. Su sitio activo de selenocisteína muy nucleófilo y accesible puede ser el objetivo principal para el diseño del fármaco (Liu y col., 2012).

La expresión aumentada de PSMD8 en el pulmón periférico puede ser potencialmente informativa de cómo están implicadas las poblaciones críticas en el desarrollo de los cánceres invasivos (Zhou y col., 1996).

SNRPD1 es una proteína nuclear ayustosómica, que está regulada en exceso en tumores malignos.

La expresión reducida de SPTBN1 está asociada con un empeoramiento del pronóstico en el cáncer de páncreas (Jiang y col., 2010).

SQSTM1 funciona como centro de señalización de varias rutas de transducción de la señal, tales como la señalización de NF-KB, la apoptosis, y la activación de Nrf2, cuya desrregulación está asociada con la enfermedad de Paget ósea y la tumorigénesis (Komatsu y col., 2012).

La expresión de PCNA predice la supervivencia en el melanoma maligno anorrectal (Ben-Izhak y col., 2002). Se ha identificado una isoforma de PCNA (caPCNA) asociada a cáncer que contenía un modelo inusual de grupos de ésteres de metilo en numerosos restos de ácido glutámico y ácido aspártico en PCNA (Hoelz y col., 2006).

El agotamiento de SRP54 en algunas líneas de células tumorales no produce fenotipos celulares abiertos, tales como la detención del crecimiento o la muerte, incluso en células seleccionadas para la reducción estable de los componentes de SRP (Ren y col., 2004).

En el nivel molecular, STAT1 inhibe la proliferación de células tumorales de ratón y humanas tratadas con IFNy mediante su capacidad de aumentar la expresión del inhibidor p21 de la quinasa dependiente de ciclina Cipl, o para disminuir la expresión de c-myc (Ramana y col., 2000). La actividad antitumoral de STAT1 está soportada además por su capacidad de inhibir la angiogénesis y la metástasis tumoral en modelos de ratón (Huang et al., 2002). Se ha comprobado que los niveles aumentados del ARNm de STAT1 eran parte de una firma molecular asociada con una mejor predicción del resultado metastásico para pacientes con receptores de hormonas negativos y cánceres de mama tiple negativos (Yau y col., 2010).

Las muestras aspiradas con aguja fina de neoplasias foliculares demostraron que los nódulos malignos expresaban en exceso STT3A en comparación con la enfermedad benigna (Patel y col., 2011).

Un metaanálisis mostró que el polimorfismo rs6504950 de STXBP41COX11 está significativamente correlacionado con riesgo de cáncer de mama (Tang y col., 2012).

Un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos indicada puede tener cambiados 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 cambie sustancialmente o resulte negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar. En un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos desvelada en la presente memoria pueden cambiarse uno o dos aminoácidos 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.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la presente invención, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos tal y como se describe más adelante.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la presente invención, en el que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, fusionado con los aminoácidos del extremo N de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii).

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

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa y/o que presenta un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de

acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente invención para su uso en medicina.

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

La presente invención se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en particular TCR solubles (TCRs), de acuerdo con la presente invención y/o con los complejos péptido-MHC del mismo, y a procedimientos para sintetizarlos.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos o a otras moléculas de unión que reconozcan los péptidos de acuerdo con la invención y/o con los complejos péptido-MHC del mismo, y procedimientos para sintetizarlos.

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

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

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

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

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferentemente consistan en, una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 300, como las desveladas con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

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

Cada soporte puede comprender un marcador que permita detectarlo una vez unido mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho marcador. Por ejemplo, el soporte se puede marcar con un

colorante fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular adecuada. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en el caso del marcador por fluorescencia, como el facilitado por un colorante fluorescente, la visualización del aptámero unido se puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 o anti-CD28. Los soportes polipeptídicos aparecen descritos, por ejemplo, en el apartado de antecedentes del documento WO2014/071978A1, y en las referencias citadas en dicho documento.

La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para producir un péptido de acuerdo con la presente invención, que comprende el cultivo de la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

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

La presente invención se refiere, además, al procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID NO. 53.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos según el procedimiento de acuerdo con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma anómala un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención.

Se desvela un procedimiento para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma anómala un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el procedimiento la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento del péptido descrito, de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, de un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, de una célula de acuerdo con la presente invención, o de un linfocito T activado de acuerdo con la presente invención.

La presente invención concierne, además, al uso de acuerdo con la presente invención, en que dicho medicamento es una vacuna, una célula, una población de células, como por ejemplo, una estirpe celular, TCR solubles y anticuerpos monoclonales.

La presente invención se refiere, además, a un uso de acuerdo con la presente invención en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso de acuerdo con la presente invención, en que dichas células cancerosas son células de carcinoma hepatocelular (CHC).

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

El término “péptido” designa en el presente documento una serie de restos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferentemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12 o 13, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos

de la invención) pueden tener hasta 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud.

Además, el término “péptido” incluye sales de una serie de restos 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 de acuerdo con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

El término “péptido” incluye también “oligopéptido”. El término “oligopéptido” designa en el presente documento una serie de restos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítopo o epítopos adecuados. Los oligopéptidos tienen una longitud inferior a 30 aminoácidos y mayor de 15.

El término “los péptidos de la presente invención” incluirá los péptidos de los que consiste o comprende un péptido tal y como se ha definido antes según las SEQ ID NO. 53.

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

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

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

En el ser humano hay tres *locus* genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C.HLA-A*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 6: 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 col. empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$ (Mori M, y col. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27). 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 col.(S.J. Chanock, y col (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

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%

(continuación)

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

(continuación)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la invención, preferentemente cuando figuren incluidos en una vacuna de la invención tal y como se describe en la presente memoria, se unirán a A*02 o a A*24. Una vacuna también podría incluir péptidos que se unan a cualquier MHC de clase II. Por consiguiente, la vacuna de la invención se puede usar para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, A*24 positivos o bien positivos para A*02 y para A*24, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

Combinar por ejemplo péptidos A*02 y A*24 en una vacuna tiene la ventaja de que se puede tratar 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 las poblaciones solo se podría tratar menos del 50% si se optara por uno solo de los alelos, la vacuna 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 la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye ADN tanto monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia. El término “región codificante” hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

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 procedimientos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

En una realización preferida, el término “secuencia nucleotídica” hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

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

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

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

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

El término “segmento de ADN” hace referencia a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de una construcción 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 procedimientos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes en dirección 5’ (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

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

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

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

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

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en “forma enriquecida”. Tal y como se usa en el presente documento, 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, preferentemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término “fragmento activo” define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunogénica) cuando se administra −solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector− a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de

estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el "fragmento activo" también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

Los péptidos originales (sin modificar) descritos en el presente documento 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 como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aun así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos

comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo 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 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

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

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

Preferentemente, cuando los linfocitos T específicos para un péptido de acuerdo con la presente invención se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferentemente como máximo de alrededor de 1 µM, más preferentemente 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 preferentemente de tres individuos.

Así pues, los epítopos desvelados 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.

Las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica principalmente de proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.

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

A la luz de los efectos secundarios graves y los gastos que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los procedimientos pronósticos y diagnósticos. Así pues, existe la necesidad de descubrir otros factores que puedan servir como biomarcadores para el cáncer en general y el carcinoma hepatocelular (CHC) en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados para el tratamiento contra el cáncer en general y contra el CHC en particular.

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente el CHC, que presentan en exceso o presentan exclusivamente los péptidos de la invención. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras humanas de CHC primario.

Se ha demostrado que el gen/proteína originario (también denominado “proteína entera” o “proteína subyacente”) del cual derivan los péptidos aparece notablemente expresado en exceso en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en la presente invención “tejidos normales” significa que son células hepáticas sanas o células de otros tejidos normales– lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios (véase ejemplo 2).Además, los péptidos en sí están fuertemente presentados en exceso en el tejido tumoral –en la presente invención se entiende por “tejido tumoral” una muestra extraída a un paciente aquejado de CHC, pero no de tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

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 CHC que presentan los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están presentados en exceso y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, de acuerdo con la presente invención (véase el Ejemplo 3).Asimismo, cuando los péptidos están acomplejados con el MHC correspondiente pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR,

en concreto TCR solubles, de acuerdo con la presente invención también. Los procedimientos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la bibliografía pertinente. Así pues, los péptidos de la presente invención son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (por ejemplo péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante).

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

Una “composición farmacéutica” preferentemente es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferentemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica de acuerdo con las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $–NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo 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 cinámico, 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 realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

Especialmente se prefiere el uso de una composición, por ejemplo de una vacuna, que comprenda los péptidos dotados de una secuencia conforme con las SEQ ID NO. 1, 2, 7, 225, 228, 301, 303 y 312 o un soporte que reaccione contra los péptidos dotados de una secuencia conforme con las SEQ ID NO. 1, 2, 7, 225, 228, 301, 303 y 312 y sus complejos con las moléculas del MHC.

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

Por tanto, se desvela un procedimiento para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho procedimiento: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I con una forma soluble de una molécula MHC de clase I 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 unido con dicho antígeno restringido a HLA.

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

Se desvela un procedimiento para producir dicho anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho procedimiento: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I con una forma soluble de una molécula MHC de clase I 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 capaz de unirse específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I unido con dicho antígeno restringido a HLA. Procedimientos pertinentes para la producción de tales anticuerpos y de complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como de otras herramientas para la producción de estos anticuerpos se desvelan en los documentos WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en Cohen CJ, y col. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. J Mol Recognit. 2003 Sep-Oct;16(5):324-32.; Denkberg G, y col. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. J Immunol. 2003 Sep 1;171(5):2197-207; y en Cohen CJ, y col. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. J Immunol. 2003 Abr 15; 170(8):4349-61.

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

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para producir un receptor de linfocito T soluble (TCRs) 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 N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, y col. Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. Nat Med 2012 Jun;18(6):980-987). 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 de sulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (véanse Boulter JM, y col. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, y col. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother 2004 Apr;53(4):345-357; y Willcox BE, y col. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. Protein Sci 1999 Nov; 8 (11):2418-2423). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en las células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en los documentos WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Se describe una combinación de sTCR en EL DOCUMENTO WO 2012/056407A1.Otros procedimientos de producción se revelan en EL DOCUMENTO WO 2013/057586A1.

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

Para seleccionar los péptidos presentados en exceso se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede consolidar después en una puntuación de presentación en exceso calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (J. Pinheiro, y col. The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2007) adjusting for multiple testing by False Discovery Rate (Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), Vol.57 (No.1):289-300, 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 sus secuencias se identificaron mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de CHC (N = 16 muestras A*02-positivas que incluyeron trece muestras A*02:01-positivas, N = 15 muestras A*24-positivas) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 31 pacientes con CHC.

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

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

muestras de tejido de CHC y se aislaron los péptidos asociados a HLA para después analizarlos con CL-EM (véanse ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de CHC primario para confirmar su presentación en el CHC primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales de CHC y normales se cuantificaron con el recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcaje. El procedimiento 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 procedimientos de análisis como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, deconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

La presente invención concierne a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 53, y a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido tiene una longitud total de 10 a 30 aminoácidos, en que dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido, cuando está unido al MHC, puede ser reconocido por linfocitos T CD8.

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

La presente invención se refiere además a un péptido de acuerdo con la presente invención en que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO. 53.

La presente invención se refiere además a los péptidos de acuerdo con la presente invención, en que dichos péptidos incluyen enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la invención, en que el péptido es parte de una proteína de fusión, comprendiendo los aminoácidos del extremo N de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii).

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico, que codifica los péptidos de acuerdo con la presente invención.

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

La presente invención se refiere además a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

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

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferentemente una célula dendrítica.

La presente invención se refiere además al procedimiento de acuerdo con la presente invención en que el antígeno es cargado en moléculas del MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad de antígeno suficiente con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere además al procedimiento de acuerdo con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID NO. 53.

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

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

La presente invención se refiere además al uso conforme con la invención, en que dichas células tumorales son células de CHC u otras células de tumores sólidos o hematológicos como cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de colon o rectal, o leucemia.

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 (por ejemplo 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 (por ejemplo, unión específica de un polipéptido marcador del CHC, liberación de una toxina en una célula de CHC que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del CHC) de acuerdo con la invención.

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

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido de acuerdo con la presente invención, como un péptido de acuerdo con las SEQ ID NO. 53, un polipéptido o fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (por ejemplo bacterias) o eucariotas (por ejemplo células de levadura, insecto o mamífero), a partir de la cual se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del CHC utilizado para generar el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para su uso previsto (por ejemplo ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con procedimientos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (por ejemplo ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, nueva 2ª edición 2013). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunotransferencia, tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con procedimientos 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 (patente de Estados Unidos N.º 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con procedimientos basados en hibridomas. En el procedimiento 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 procedimientos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (por ejemplo con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los procedimientos *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 EL DOCUMENTO 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 restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva,

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

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

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, a un anticuerpo humanizado se le introducen uno o varios restos de aminoácidos de origen no humano. Estos restos 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 la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Pat. 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 CDR y posiblemente algunos residuos FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

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

Los anticuerpos de la invención se administran preferentemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución oscile aproximadamente entre 5 y 8, y más preferentemente 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, por ejemplo 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 procedimientos como la infusión que aseguren su liberación efectiva en el torrente sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

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

La transcripción del ADN genómico que codifica el antígeno tumoral diana, o el procesamiento/transporte/traducción y/o la estabilidad del ARNm del antígeno tumoral diana.

Los ácidos nucleicos de sentido contrario se pueden administrar mediante una variedad de estrategias. Por ejemplo, los oligonucleótidos de sentido contrario o el ARN de sentido contrario puede administrarse directamente (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a un sujeto en una forma que permita la captación en células tumorales. Como alternativa, los vectores víricos o plásmidos que codifican el ARN (o fragmentos de ARN) de sentido contrario puede introducirse en células *in vivo*. Se pueden inducir también efectos de sentido contrario mediante secuencias de sentido directo; sin embargo, la extensión de cambios fenotípicos es muy variable. Los cambios fenotípicos inducidos por terapias de sentido contrario eficaces se evaluaron de acuerdo con los cambios en, por ejemplo, los niveles de ARNm diana, los niveles de proteínas diana, y/o los niveles de actividad de proteínas diana.

En un ejemplo específico, la inhibición de la función marcadora de la diana HCC por una terapia génica de sentido contrario puede llevarse a cabo mediante la administración directa de un ARN marcador tumoral de sentido contrario a un sujeto. El ARN marcador tumoral de sentido contrario puede producirse y aislarse mediante una técnica convencional, pero se produce más fácilmente mediante transcripción *in vitro* usando un ADNc marcador tumoral de sentido contrario bajo el control de un promotor de alta eficacia (por ejemplo, el promotor T7). La administración de un ARN marcador tumoral de sentido contrario a las células puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los procedimientos para administración directa de ácido nucleico descritos a continuación.

Una estrategia alternativa para inhibir la función de una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en las proteínas anteriormente mencionadas, y lo más preferido de APOB, FASN, y/o COPA, implica el uso de un ácido nucleico (por ejemplo, ARNip, o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o una parte del mismo dirigido contra una proteína, que se puede transferir a células cancerosas u otras células, produciendo la expresión y secreción del anticuerpo intracelular), una proteína o molécula pequeña, o cualquier otro compuesto que dirige la expresión, la traducción, y/o la función biológica de esta proteína.

En los procedimientos descritos anteriormente, que incluyen la administración y la captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, la transducción o la transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en forma de ADN puro o de ácido nucleico. Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, 3H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1 x 10 μM.

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

Como se ha dicho antes, la presente invención proporciona, pues, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 53, y a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido tiene una longitud total de 10 a 30 aminoácidos, en que dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido, cuando está unido al MHC, puede ser reconocido por linfocitos T CD8.

En la presente invención el término “homólogo” se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha “homología” se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar.

La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Fong L, y col. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Jul 17;98(15):8809-14;

Zaremba S, y col. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20): 4570-7; Colombetti S, y col. Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity. J Immunol. 2006 Jun 1;176(11):6560-7; Appay V, y col. Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. Eur J Immunol. 2006 Jul;36(7):1805-14).

Por "variante" de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los restos 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 NO. 53. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Godkin A, y col. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). Int Immunol. 1997 Jun;9(6):905-11) y de las bases de datos científicas (Rammensee H. y col. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):213-9), 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 NO. 53, 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. Las variantes dadas a conocer conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar a las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

Aquellos restos 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.

Tabla 8: Variantes y motivos de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO. 1, 117 y 246

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 1	V	M	A	P	F	T	M	T	I
Variantes									V
									L
									A
		L							V
		L							L
		L							
		L							A
		A							V
		A							L
		A							
		A							A
		V							V
		V							L
		V							
		V							A
		T							V

(continuación)

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		T							L
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							L
		Q							
		Q							A
SEQ ID NO. 246	K	L	I	S	S	Y	Y	N	V
Variantes		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A

(continuación)

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 117	Y	A	F	P	K	S	I	T	V
Variantes									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A

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

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos de un epítopo de MHC de clase I en los que el péptido tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente entre 8 y 30, y más preferentemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos.

Por supuesto, el péptido de acuerdo con la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II. La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC se puede analizar con procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización preferida de la invención el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO. 53.

En una realización de la presente invención, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos del extremo N de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo “Ii”) tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497.

Además, el péptido puede ser modificado 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 mediante la introducción de enlaces no peptídicos.

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retroinversos pueden sintetizarse con procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere y col. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y col. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T auxiliares. Los péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH2-NH, -CH2S-, -CH2CH2-, -CH=CH-, -COCH2-, -CH(OH)CH2- y -CH2SO-. La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un procedimiento para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-CH_2$-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$. La estabilidad, biodisponibilidad, y/o afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrófobos tales como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los péptidos en los extremos amino. Del mismo modo, un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo pueden colocarse en los extremos amino de los péptidos. Adicionalmente, el grupo hidrófobo, tbutiloxicarbonilo o un grupo amido pueden añadirse a los péptidos en los extremos carboxi.

Además, se pueden sintetizar los péptidos de la invención para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, se puede usar el isómero D de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido, en lugar del isómero L habitual. Adicionalmente, al menos uno de los restos de aminoácidos de los péptidos de la invención puede estar sustituido por uno de los restos de aminoácidos de origen no natural bien conocido. Alteraciones tales como estas pueden servir para aumentar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la acción de unión de los péptidos de la invención.

De manera similar, se puede modificar químicamente un péptido o variante de la invención haciendo reaccionar los aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Los ejemplos de dichas modificaciones son bien conocidos en la técnica y se resumen, por ejemplo, en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3ª ed. CRC Press, 2005, que se incorpora al presente documento por referencia. La modificación química de los aminoácidos incluye, aunque no de forma limitativa, la modificación mediante acilación, la amidinación, la piridoxilación de la lisina, la alquilación reductora, la trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), la modificación de la amida de los grupos carboxilo y la modificación del sulfhidrilo mediante la oxidación del ácido perfórmico de la cisteína a ácido cisteico, la formación de derivados de mercurio, la formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, la reacción con maleimida, la carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y la carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitarse a lo anterior. En este sentido, la persona experta se deriva al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan y col. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) para una metodología más extensa que se refiere a la modificación de proteínas.

En resumen, la modificación de, por ejemplo, restos de arginilo en proteínas se basa a menudo en la reacción de los compuestos de dicarbonilo vecinales tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, y 1,2-ciclohexanodion para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción de metilglioxal con restos de arginina. Se puede modificar la cisteína sin modificación simultánea de otros sitios nucleófilos tales como lisina e histidina. Como resultado, está disponible un gran número de reactivos para la modificación de la cisteína. Los sitios web de empresas tales como Sigma-Aldrich (http://www.sigma-aldrich.com) proporcionan información sobre los reactivos específicos.

Es también común la reducción selectiva de enlaces disulfuro en proteínas. Se pueden formar enlaces disulfuro y oxidarse durante el tratamiento térmico de los agentes biofarmacéuticos. Se puede usar el reactivo K de Woodward para modificar los restos de ácido glutámico específicos. Se puede usar la N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar retículas intramoleculares entre un resto de lisina y un resto de ácido glutámico. Por ejemplo, dietilpirocarbonato es un reactivo para la modificación de restos histidilo a proteínas. Se puede modificar también la histidina usando 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los restos de lisina y otros grupos amino es, por ejemplo, útil en la unión de péptidos a superficies o para la reticulación de las proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de unión del poli(etilen)glicol y el sitio principal de modificación en la glicosilación de las proteínas. Se pueden modificar los restos de metionina en las proteínas con, por ejemplo, yodoacetamida, bromoetilamina, y cloramina T.

Se pueden usar tetranitrometano y N-acetilimidazol para la modificación de restos tirosilo. Se puede llevar a cabo la reticulación mediante la formación de ditirosinade peróxido de hidrógeno/cobre.

Recientes estudios sobre la modificación del triptófano han usado N-bromosuccinimida, bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-escatol).

Un péptido que incluye enlaces no peptídicos es una realización preferida de la invención. En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los restos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el procedimiento de Fmoc-poliamida, como muestran Lukas y col. (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci USA. May 1981; 78(5): 2791–2795) y las referencias citadas en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían

proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparagina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrilo para proteger los grupos funcionales amida de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloiletilendiamina (entrelazante) y acriloilsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparagina 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 al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo Bruckdorfer y col., 2004, y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores se eliminan con un procedimiento de extracción simple 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 una sola o una 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 por ejemplo 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.

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

Se han desarrollado diversos procedimientos 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 procedimiento 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 procedimiento deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido dado a conocer emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK, y col. (Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):537-41). Este procedimiento 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 de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido de la invención puede ser utilizado de acuerdo con técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE.UU. N.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

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

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

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

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

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

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general provistos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcaje de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

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

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

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferentemente 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 están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como

CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence “Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols,” Part One, Segunda edición, 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 la construcción de ADN de la presente invención se consuma con procedimientos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y col (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook y col (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.

La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman y col (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU. El procedimiento de Beggs (1978) Nature 275,104-109 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 una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

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

En una realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. el 29 de abril de 2010 para el tratamiento del cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel–T) (Small EJ, y col. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J Clin Oncol. 2006 Jul 1;24(19):3089-94. Rini y col. Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. Cancer. 2006 Jul 1;107(1):67-74).

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

En otra realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido puede ser preparado para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los procedimientos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los procedimientos 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, preferentemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter y col Nature Medicine 18, 1254–1261 (2012)).

Otro aspecto de la presente invención incluye un procedimiento in vitro para producir linfocitos T activados, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto en condiciones in vitro de linfocitos T con moléculas MHC humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido de acuerdo con la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

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

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 Karre y col 1985. (Ljunggren, H.-G., y K. Karre. 1985. J. Exp. Med. 162:1745).

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 3Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas coestimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítopo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno se transfecta para expresar un epítopo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión que expresa un péptido que contenga la SEQ ID NO. 53.

Existen otros procedimientos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski y col. (Induction of peptide-specific primary cytotoxic T lymphocyte responses from human peripheral blood. Eur J Immunol. 1995 Jun;25(6):1783-7) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y col. 2003 (Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad coestimuladora 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 EL DOCUMENTO WO 97/26328 se describe detalladamente un procedimiento. 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, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta y col. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology. 1994 Ago 1;202(2):949-55), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho procedimiento reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma anómala un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 53.

Preferentemente 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 procedimiento para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma anómala un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por “individuo sano” los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.

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

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

Por “expresado de forma anómala” los inventores también quieren decir que el polipéptido está expresado en exceso 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 “expresado en exceso” los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido

es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferentemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferentemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los linfocitos T se pueden obtener por procedimientos 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: Gattinoni L, y col. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):383-93. Review. y Morgan RA, y col. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9).

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

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

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 53, y al menos otro péptido adicional, preferentemente dos a 50, más preferentemente dos a 25, incluso más preferentemente dos a 20 y más preferentemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los procedimientos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una perspectiva general en, por ejemplo (Pascolo y col., Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 2005 Aug;62(15):1755-62). 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 adenoasociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los procedimientos de introducción físicos, como la “pistola génica”, también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítopo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (por ejemplo respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T auxiliares (T_H) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren

los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science 1995 Nov 10;270(5238):932-3). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (por ejemplo el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (por ejemplo GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich, 1996 Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells Nat Med. 1996 Oct;2(10):1096-103).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran juntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006).La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (por ejemplo, AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (por ejemplo, anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

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

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

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

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente 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, 3ª Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

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

La presente invención también contempla un kit que comprende:

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

El kit 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 preferentemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los kits de la presente invención comprenden, preferentemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo 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. Preferentemente el kit y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

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

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

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

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

El envase de un kit 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 kit contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El kit también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferentemente el kit terapéutico contendrá un aparato (por ejemplo, una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente kit.

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

Puesto que los péptidos de la invención proceden de tejido tumoral relacionado con el CHC, el medicamento de la invención debe ser utilizado preferentemente para tratar el CHC.

Como se usa en el presente documento, el término "almacén" se referirá a un grupo de péptidos que se han precribado para determinar la inmunogenicidad y/o para determinar la presentación en exceso en un tipo de tumor concreto. No se pretende que el término "almacén" implique que los péptidos concretos incluidos en la vacuna se hayan prefabricado y almacenado en una instalación física, aunque se contempla esta posibilidad. Se contempla de forma expresa que los péptidos puedan fabricarse *de novo* para cada vacuna individualizada producida, o pueden prefabricarse y

almacenarse. El almacén (por ejemplo, en la forma de una base de datos) se compone de péptidos asociados a tumores que se expresan en exceso intensamente el tejido tumoral de pacientes de HCC con diversos alelos HLA-A HLA-B y HLA-C. Este puede contener péptidos MHC de clase I y péptidos MHC de clase II o péptidos MHC de clase I alargados. Además de los péptidos asociados a tumores recogidos de diversos tejidos de HCC, el almacén puede contener péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten la comparación de la magnitud de la inmunidad de los linfocitos T inducida por TUMAPS de una manera cuantitativa y por tanto permiten extraer conclusiones sobre la capacidad de la vacuna para estimular respuestas antitumorales. En segundo lugar, funcionan como importantes péptidos del control positivo derivados de un no "autoantígeno" en el caso de que no se observe ninguna respuesta de linfocitos T inducida por vacuna en los TUMAP derivados de 'auto'antígenos. Y en tercer lugar, pueden permitir sacar conclusiones, con respecto al estado de la inmunocompetencia del paciente.

Los TUMAP para el almacén se identifican usando estrategias genómicas funcionales integradas que combinan el análisis de la expresión génica, la espectrometría de masas, y la inmunología de los linfocitos T (XPresident ®). La estrategia asegura que solo los TUMAP que están presentes verdaderamente en un alto porcentaje de tumores pero que no se expresan, o se expresan solo mínimamente en tejido normal, se seleccionan para el análisis adicional. Para la selección inicial de péptidos, las muestras de HCC procedentes de pacientes y de sangre de donantes sanos se analizaron en una estrategia por etapas:

1. Ligandos de HLA procedentes de material maligno se identificaron mediante espectrometría de masas
2. Se usó el análisis de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de genoma amplio para identificar genes que se expresaban en exceso en el tejido maligno (HCC) en comparación con un conjunto de órganos y tejidos normales
3. Los ligandos de HLA identificados se compararon con los datos de la expresión génica. Los péptidos presentados en exceso o presentados selectivamente en el tejido tumoral, codificados preferentemente de forma selectiva

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna de acuerdo con la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición se ha diseñado específicamente de modo tal que se espera que todo aquel tumor que sea positivo para HLA-A*02 y/o HLA-A*24 exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. A la vista de los análisis experimentales que lo sustentan esto parece estar asegurado para cada uno de los subgrupos de péptidos específicos de los dos alelos HLA de clase I (A*02 y A*24). Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad sin necesidad de receta 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 y col., 2001; Walter y col., 2012).

En un aspecto, los péptidos se precriban para determinar la inmunogenicidad entes de incluirse en el almacén. A modo de ejemplo y sin limitación, la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en el almacén se determina mediante un procedimiento que comprende el cebado de los linfocitos T *in vitro* mediante estimulaciones repetidas de linfocitos T CD8+ procedentes de donantes sanos con células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con complejos de péptidos/MHC y antcuerpos dirigidos contra CD28.

Se prefiere este procedimiento para los cánceres raros y pacientes con perfiles de expresión raros. En contraste a los cócteles multipéptidos con una composición fija como se desarrollan actualmente, los almacenes permiten un emparejamiento significativamente mayor de la expresión real de los antígenos en el tumor con la vacuna. Se usarán péptidos seleccionados individualmente o combinaciones de varios péptidos "disponibles en el mercado" para cada paciente en una estrategia multiobjetivo. En teoría, una estrategia basada en la selección de, por ejemplo, 5 péptidos antigénicos diferentes procedentes de una biblioteca de 50 conduciría ya a aproximadamente 17 millones de composiciones de productos farmacológicos posibles (DP).

En un aspecto, los péptidos se seleccionan para su inclusión en la vacuna en función de su adecuabilidad para el paciente individual basándose en el procedimiento de acuerdo con la presente invención que se describe en el presente documento, o como a continuación.

Los datos del fenotipo HLAtranscriptómicos y peptidómicos se clasifican a partir del material tumoral del paciente y de las muestras de sangre para identificar los péptidos más adecuados y que contienen TUMAP "almacenes" y únicos (es decir, mutados) de pacientes. Se seleccionarán aquellos péptidos, que se expresan selectivamente o se expresan en exceso en los tumores de los pacientes y, cuando sea posible, muestren una fuerte inmunogenicidad *in vitro* si se ensayan con las PBMC de pacientes individuales.

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante un procedimiento que comprende: (a)

identificar los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentados en una muestra de tumor procedente del paciente individual; (b) comparar los péptidos identificados en (a) con un almacén (base de datos) de péptidos como se ha descrito anteriormente; y (c) seleccionar al menos un péptido procedente del almacén (base de datos) que se correlaciona con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP presentados por la muestra tumoral se identifican: (a1) comparando los datos de la expresión procedentes de la muestra tumoral con los datos de la expresión procedentes de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que están expresadas en exceso o expresadas de manera anómala en la muestra tumoral; y (a2) correlacionando los datos de expresión con las secuencias de los ligandos de MHC unidos a las moléculas MHC de clase y/o clase II en la muestra tumoral para identificar los ligandos de MHC derivados de proteínas expresadas en exceso o expresadas de manera anómala por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos de MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos procedentes de las moléculas de MHC aisladas procedentes de la muestra tumoral, y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

De forma adicional o como alternativa, mediante la selección de péptidos utilizando un modelo de almacén (base de datos), se pueden identificar los TUMAP en el paciente *de novo* y, a continuación, incluirse en la vacuna. Como ejemplo, se pueden identificar los TUMAP candidatos en el paciente (a1) comparando los datos de la expresión procedentes de la muestra tumoral con los datos de la expresión procedentes de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que están expresadas en exceso o expresadas de manera anómala en la muestra tumoral; y (a2) correlacionando los datos de expresión con las secuencias de los ligandos de MHC unidos a las moléculas MHC de clase y/o clase II en la muestra tumoral para identificar los ligandos de MHC derivados de proteínas expresadas en exceso o expresadas de manera anómala por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar las proteínas que contienen mutaciones que son únicas en la muestra tumoral con respecto al tejido correspondiente normal procedente del paciente individual, y se pueden identificar los TUMAP que se dirigen específicamente a la mutación. Por ejemplo, se puede secuenciar el genoma del tumor y del tejido normal correspondiente mediante la secuenciación completa del genoma: Para el descubrimiento de mutaciones no sinónimas en las regiones de los genes que codifican las proteínas, el ADN y el ARN genómicos se extraen de los tejidos tumorales y el ADN de la línea germinal normal no mutada se extrae de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia NGS aplicada se confina a la resecuenciación de las regiones que codifican proteínas (resecuenciación del exoma). A tal fin, el ADN exónico procedente de muestras humanas se captura usando kits de enriquecimiento de dianas suministrados por el vendedor, seguido por secuenciación con, por ejemplo, un HiSeq2000 (Illumina). Adicionalmente, el ARNm tumoral se secuencia para la cuantificación directa de la expresión génica y la validación de que los genes mutados se expresan en el de los pacientes. Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte del producto. La concentración de cada solución de péptido se escoge dependiendo del número de péptidos que formarán parte del producto. Cada solución de péptido y DMSO se mezcla en partes iguales para obtener una solución que contenga todos los péptidos del producto con una concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye a 1:3 con agua para inyectables hasta alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33%.

La solución diluida se filtra con un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

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

A continuación se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes que muestran las realizaciones preferidas de la misma a título ilustrativo, sin que con ello se pretenda limitar la invención.

En las Figuras:

La Figura 1 muestra la presentación en exceso de varios péptidos en tejidos normales (gris oscuro) y en el CHC (gris claro). Figura 1A) APOB, Péptido: ALVDTLKFV (A*02) (SEQ ID NO. 7), tejidos de izquierda a derecha; 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1B) ALDH1L1, Péptido: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID NO. 2), tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1C) C8B, Péptido: AYLLQPSQF (A*24) (SEQ ID NO. 200), tejidos de izquierda a derecha: 2 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 pulmones, 3 páncreas, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 úteros y 9 hígados; Figura 1D) - RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID NO. 63) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio

periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1E) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID NO. 63) 5 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 glándula suprarrenal), 16 tejidos cancerosos (2 cánceres cerebrales, 4 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vejiga urinaria y 3 cánceres de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1F) RFNG RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO. 63) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1G) RFNG, Péptido: RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO. 92) 2 estirpes celulares, 2 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales), 17 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 5 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 2 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1H) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID NO. 104) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1I) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID NO. 104) 9 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 intestino normal), 16 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 5 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1J) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO. 156) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1K) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO. 156) 7 estirpes celulares, 2 cultivos primarios, 1 tejido normal (1 colon), 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 2 leucemias leucocíticas, 4 cánceres hepáticos, 11 cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 5 cánceres de ovario y 4 cánceres de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha); Figura 1L) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID NO. 47) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1M) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID NO. 47) 1 enfermedad de otro tipo, 2 tejidos normales (1 pulmón, 1 bazo), 35 tejidos cancerosos (5 cánceres cerebrales, 6 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 6 cánceres hepáticos, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 4 cánceres de recto y 2 cánceres de estómago) (de izquierda a derecha).

La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios desvelados que están fuertemente expresados en exceso o que se expresan exclusivamente en el CHC en un conjunto de tejidos normales (gris oscuro) y de 12 muestras de CHC (gris). Figura 2A) APOB, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero, 1 vena; Figura 2B) AMACR, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero, 1 vena; Figura 2C) ALDH1L1, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero, 1 vena; Figura 2D) FGG, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero, 1 vena; Figura 2E) C8B, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero, 1 vena; y Figura 2F) HSD17B6, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello de útero, 1 útero y 1 vena.

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

La Figura 4 muestra la tinción multimérica 2D con A*24/ KLHL24-001 (A) o con A*24/ APOB-006 (B). Los recuadros de la izquierda (A y B) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*24/péptido irrelevantes

Ejemplos

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes procedían de la Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübinga, Alemania; Istituto Nazionale Tumori "Pascale". Struttura Complessa Biologia Molecolare e Oncogenesi Virale, Via Mariano, Nápoles, Italia; Bio-Options Inc., Brea, California, EE. UU; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE. UU.; Asterand Europe, Royston Herts, Reino Unido. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70 ºC o una temperatura inferior 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, K., 1991; Seeger, F.H. T y col., 1999) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Análisis por espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos 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 procedimiento 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 por CL-EM sin marcaje se efectuó con recuento iónico, es decir, mediante la extracción y el análisis de las características mostradas por la CL-EM (Mueller y col. 2007a). El procedimiento 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 y col. 2007b; Sturm y col. 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 CHC con muestras de tejido normal de referencia.

En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerrepresentados a modo de ejemplo. Los niveles de presentación de los péptidos indicados ilustrativos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Grados de presentación. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen presentado fuertemente en exceso con respecto a un grupo de tejidos normales (+++), presentados muy en exceso con respecto a un grupo de tejidos normales (++) o presentado en exceso comparado con un grupo de tejidos normales (+). S* = fosfoserina

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	+++
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
6	KLSPTVVGL	+++
7	ALVDTLKFV	+++
8	KLLEEATISV	+
9	ALANQKLYSV	+
10	SLLEEFDFHV	+++
11	SLSQELVGV	+
12	FLAELAYDL	+++
14	ALADLTGTVV	+++
15	LLYGHTVTV	+
16	SLLGGNIRL	++
17	RVASJPTSGV	+
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
22	RIAGIRGIQGV	+++
23	RLYDPASGTISL	+
24	SLAEEKLQASV	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
26	SLLHTIYEV	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
30	YLGEGPRMV	++
31	YQMDIQQEL	++
32	ALNAVRLLV	+++
33	LLHGHIVEL	+

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
34	SLAEGTATV	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+++
40	ALLAEGITWV	+
42	ALLGGNVRMML	+++
44	ALQDAIRQL	+
47	FLDTPIAKV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
51	GLAEELVRA	+
52	GLFNAELLEA	+
53	GLIHLEGDTV	+++
54	GLLDPNVKSIFV	+++
55	GLYGRTIEL	+
56	GVLPGLVGV	+
57	HLTEAIQYV	++
58	ILADLNLSV	+
59	ILADTFIGV	++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	++
66	KLHEEIDRV	++
67	KLKETIQKL	+++
70	KLLDLETERILL	++
71	KLLDNWDSV	+++
72	KLSEAVTSV	+
75	KQMEPLHAV	+
76	LLADIGGDPFAA	+++
77	LLHEENFSV	+
79	LLLSTGYEA	+++
81	NLASFIEQVAV	++
82	NVFDGLVRV	+
83	QLHDFVMSL	+++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	+
86	RLAAFYSQV	+++
88	RLIDRIKTV	+++
89	RLIEEIKNV	+++
91	RLPDIPLRQV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+++
96	SLLEEPNVIRV	++
97	SLLPQLIEV	++
98	SLLSPEHLQYL	++
99	SLSAFLPSL	+++
101	SLWEGGVRGV	+++
103	SMGDHLWVA	+++
107	TLGQFYQEV	+++
108	TLLKKISEA	+++
109	TLYALSHAV	+
111	TVMDIDTSGTFNV	+
113	VLMDKLVEL	++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	+++
117	YAFPKSITV	+++
119	YLDKNLTVSV	+
120	YLGEEYVKA	+++
121	YLITGNLEKL	+
122	YLSQAADGAKVL	+++
123	YLWDLDHGFAGV	++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	++
127	VLIGSNHSL	+
128	GLAFSLNGV	+
129	SQADVIPAV	+
130	ALDAGAVYTL	++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
131	ALDSGAFQSV	++
132	ALHEEVVGV	+
133	ALLEMDARL	+
134	ALLETNPYLL	++
135	ALLGKIEKV	+
137	ALPTVLVGV	++
139	ALSSKPAEV	+
142	AVIGGLIYV	++
144	FIQLITGV	+
146	FLWTEQAHTV	+
147	GLAPGGLAVV	+
148	GLFAPLVFL	+++
151	HLAKVTAEV	+
154	KLTDHLKYV	+
161	RLLDEQFAV	+
162	RLMSALTQV	++
163	RLTESVLYL	++
164	RMLIKLLEV	+
167	SLAESSFDV	++
168	SLAVLVPIV	+
169	SLFEWFHPL	+
170	SLHNGVIQL	+
171	SLIPAVLTV	+
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
174	TLAELGAVQV	+
176	TLGQIWDV	+
177	VLDEPYEKV	+
179	YIHNILYEV	++
180	YLGPHIASVTL	++
181	YLLEKFVAV	+
184	VVLDGGQIVTV	+
185	ALFPALRPGGFQA	++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
186	VLLAQIIQV	+
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+
189	AFSPDSHYLLF	+++
190	RYNEKCFKL	+++
191	KYPDIISRI	++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+++
194	QYASRFVQL	+++
195	RYAPPPSFSEF	+++
196	AYLKWISQI	+++
197	RWPKKSAEF	+
198	LYWSHPRKF	+
200	AYLLQPSQF	+++
201	AYVNTFHNI	+++
202	AYGTYRSNF	+++
203	YYGILQEKI	+++
204	KYRLTYAYF	++
205	VYGLQRNLL	+
206	KWPETPLLL	+++
208	SYNPAENAVLL	++
210	AYPAIRYLL	++
211	IYIPSYFDF	++
212	VYGDVISNI	+++
213	YYNKVSTVF	+
214	IYVTSIEQI	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+
219	GVMAGDIYSV	+
220	SLLEKELESV	++
221	ALCEENMRGV	+
224	ALASVIKEL	+
225	KMDPVAYRV	+

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
226	AVLGPLGLQEV	+
227	ALLKVNQEL	+
228	YLITSVELL	++
229	KMFESFIESV	++
230	VLTEFTREV	+
231	RLFNDPVAMV	++
233	ALLGKLDAI	+
234	YLEPYLKEV	+
236	ALADKELLPSV	++
237	ALRGEIETV	+++
238	AMPPPPPQGV	++
239	FLLGFIPAKA	+
240	FLWERPTLLV	+++
241	FVLPLLGLHEA	++
242	GLFAPVHKV	+
243	GLLDNPELRV	+++
244	KIAELLENV	+
245	KLGAVFNQV	+
248	KLNDLIQRL	+
249	LLLGERVAL	+++
250	NLAEVVERV	++
251	RLFADILNDV	++
252	RTIEYLEEV	+
253	RVPPPPQSV	+
255	SLFGQDVKAV	+++
256	SLFQGVEFHYV	+
257	SLLEKAGPEL	+++
258	SLMGPVVHEV	+
260	TLMDMRLSQV	++
261	VLFQEALWHV	++
263	VLYPSLKEI	+
264	VMQDPEFLQSV	++
265	WLIEDGKVVTV	++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
266	SLLESNKDLLL	+
267	ALNENINQV	+
268	KLYQEVEIASV	+
269	YLMEGSYNKV	+
270	SVLDQKILL	++
271	LLLDKLILL	+
272	QQLDSKFLEQV	+
273	AILETAPKEV	++
274	ALAEALKEV	+
275	ALIEGAGILL	++
276	ALLEADVNIKL	+
277	ALLEENSTPQL	+
278	ALTSVVVTL	+
279	ALWTGMHTI	+
281	GLLAGDRLVEV	+
282	GQFPSYLETV	++
283	ILSGIGVSQV	+
284	KLDAFVEGV	+
286	KVLDKVFRA	+
288	LLDDSLVSI	+
289	LLLEEGGLVQV	++
290	NLIDLDDLYV	++
292	RIPAYFVTV	+
293	FLASESLIKQI	++
295	SLFSSPPEI	++
297	TLFYSLREV	+
298	TMAKESSIIGV	++
299	ALLRVTPFI	+
301	VLADFGARV	+++
302	KIQEILTQV	+++
303	GVYDGEEHSV	+
304	SLIDQFFGV	+++
305	GVLENIFGV	+

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Presentación del péptido
308	ALLRTVVSV	+
309	GLIEIISNA	+
310	SLWGGDVVL	+
311	FLIPIYHQV	+
312	RLGIKPESV	+++
313	LTAPPEALLMV	+
314	YLAPFLRNV	+
315	KVLDGSPIEV	+
316	LLREKVEFL	+
317	KLPEKWESV	++
318	KLNEINEKI	+
319	KLFNEFIQL	+
320	GLADNTVIAKV	+
322	ILYDIPDIRL	+
324	RLFETKITQV	++
326	ALSDGVHKI	++
327	GLNEEIARV	++
328	RLEEDDGDVAM	+
329	SLIEDLILL	+++
330	SMSADVPLV	++
332	AMLAVLHTV	+
334	SILTIEDGIFEV	+
335	SLLPVDIRQYL	++
336	YLPTFFLTV	+
337	TLLAAEFLKQV	+
338	KLFDSDPITVTV	+++
340	KVFDEVIEV	+
342	AMSSKFFLV	+
343	LLLPDYYLV	+
345	SYNPLWLRI (A*24)	+++
346	LYQILQGIVF (A*24)	+++
347	ALNPADITV	+

Ejemplo 2

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

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

Fuentes de ARN y preparación

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversas instituciones (véase el Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos procedimientos 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, Amsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, California, EE.UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción.

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

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes por defecto en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos 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 Fig. 2 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios desvelados que aparecen muy expresados en exceso o que se expresan exclusivamente en el CHC. Los grados de expresión de otros genes mostrados ilustrativos se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: Grados de expresión. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen expresados fuertemente en exceso con respecto a un grupo de tejidos normales (+++), expresados muy en exceso con respecto a un grupo de tejidos normales (++) o expresados en exceso comparado con un grupo de tejidos normales (+). S* = fosfoserina

SEQ ID NO.	Secuencia	Expresión génica
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Expresión génica
7	ALVDTLKFV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Expresión génica
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++
109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPAV	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Expresión génica
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISSF	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Expresión génica
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

Ejemplo 3: Intercambio de ligandos por UV

Los péptidos candidatos para los tratamientos con linfocitos T desvelados se sometieron a nuevos análisis para determinar su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los diferentes complejos de péptido-MHC se produjeron con intercambio de ligandos por UV, técnica en la que un péptido sensible a los rayos UV se escinde tras exponerlo a dicha radiación y se intercambia por el péptido de interés que se pretende analizar. Sólo los candidatos peptídicos que pueden unirse y estabilizar las moléculas de MHC receptoras del péptido evitan la disociación de los complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo un ELISA basado en la detección de la cadena liviana (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y col. (Rodenko B, Toebes M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ovaa H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32.).

Placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) se incubaron toda la noche con estreptavidina 2 µg/ml en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron a 1:100 con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se 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 $NH2SO_4$.La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que presentan un rendimiento de intercambio elevado (preferentemente superior al 50% y más preferentemente superior al 70%) se prefieren en general para la generación y la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o de fragmentos funcionales de los mismos, ya que muestran la suficiente avidez hacia las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos MHC.

Tabla 10A: Niveles de unión a MHC de clase I

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 %= +++; >= 75 % = ++++		
SEQ ID	Código del péptido	Intercambio del péptido
12	GPC3-001	++++
5	APOB-001	++++
7	APOB-002	++++
1	APOB-003	++++
13	HSD11B1-001	++++
227	SAMM-001	++++
4	APOB-004	++++
232	MAPKAPK5-001	++++
10	USO-001	++++
304	USP14-001	++++
219	ADF-012	++++
223	IDI1-001	++++
224	IFT81-001	++++
14	NCST-001	++++
228	ACSL4-001	++++
230	IPO9-001	++++
15	SLC35B2-001	++++
16	ACSL3-001	++++
303	MAGEB2-001	+++
226	THT-001	+++
8	DYM-001	+++
6	AXIN2-001	+++
225	QAR-001	+++
2	ALDH1L1-001	+++
221	EEF2-001	+++
220	DRG2-001	+++
301	C1QTNF3-001	+++
11	ZNF318-001	+++

Tabla 10B: Niveles de unión a MHC de clase I

La unión de péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A*02 o a HLA-A*24 según la secuencia peptídica se clasificó mediante el nivel de intercambio peptídico: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = ++++. S* = fosfoserina		
SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
1	VMAPFTMTI	"++++"
2	KLQAGTVFV	"+++"
3	ILDDNMQKL	"+++"
4	KLQDFSDQL	"++++"
5	ALVEQGFTV	"++++"
6	KLSPTVVGL	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
7	ALVDTLKFV	"++++"
8	KLLEEATISV	"+++"
9	ALANQKLYSV	"+++"
10	SLLEEFDFHV	"++++"
11	SLSQELVGV	"+++"
12	FLAELAYDL	"++++"
13	GLIDTETAMKAV	"++++"
14	ALADLTGTVV	"++++"
15	LLYGHTVTV	"++++"
16	SLLGGNIRL	"++++"
17	RVAS*PTSGV	"+++"
18	ALYGKTEVV	"+++"
19	FLEETKATV	"+++"
20	KLSNVLQQV	"++++"
21	QLIEVSSPITL	"++++"
22	RIAGIRGIQGV	"++++"
23	RLYDPASGTISL	"+++"
24	SLAEEKLQASV	"+++"
25	SLDGKAALTEL	"+++"
26	SLLHTIYEV	"+++"
27	TLPDFRLPEI	"++++"
28	TLQDHLNSL	"+++"
29	YIQDEINTI	"+++"
30	YLGEGPRMV	"+++"
31	YQMDIQQEL	"+++"
32	ALNAVRLLV	"++++"
33	LLHGHIVEL	"+++"
34	SLAEGTATV	"+++"
35	SLQESILAQV	"+++"
36	ILNVDGLIGV	"+++"
37	LLLPLLPPLSP	"+++"
38	ALADVVHEA	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
39	ALDPKANFST	"+++"
40	ALLAEGITWV	"+++"
41	ALLELDEPLVL	"++++"
42	ALLGGNVRMML	"+++"
43	ALLGVWTSV	"++"
44	ALQDAIRQL	"++++"
45	ALQDQLVLV	"++++"
46	AMAEMKVVL	"+++"
47	FLDTPIAKV	"++"
48	FLLEQPEIQV	"+++"
49	FLYPEKDEPT	"++"
50	FTIPKLYQL	"++"
51	GLAEELVRA	"++"
52	GLFNAELLEA	"+++"
53	GLIHLEGDTV	"+++"
54	GLLDPNVKSIFV	"+++"
55	GLYGRTIEL	"+++"
56	GVLPGLVGV	"+++"
57	HLTEAIQYV	"+++"
58	ILADLNLSV	"++++"
59	ILADTFIGV	"+++"
60	ILSPLSVAL	"++++"
61	KIADFELPTI	"++++"
62	KIAGTNAEV	"++"
63	KIDEKNFVV	"+++"
64	KILEETLYV	"+++"
65	KLFSGDELLEV	"+++"
66	KLHEEIDRV	"+++"
67	KLKETIQKL	"+++"
68	KLLAATVLLL	"++"
69	KLLDEVTYLEA	"++++"
70	KLLDLETERILL	"++++"
71	KLLDNWDSV	"++++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
72	KLSEAVTSV	"+++"
74	KLYDLELIV	"+++"
75	KQMEPLHAV	"++"
76	LLADIGGDPFAA	"+++"
77	LLHEENFSV	"+++"
78	LLIDDEYKV	"+++"
80	LLYEGKLTL	"++++"
81	NLASFIEQVAV	"+++"
82	NVFDGLVRV	"+++"
83	QLHDFVMSL	"++++"
84	QLTPVLVSV	"+++"
85	RILPKVLEV	"+++"
86	RLAAFYSQV	"+++"
87	RLFEENDVNL	"+++"
88	RLIDRIKTV	"++"
89	RLIEEIKNV	"++"
90	RLLDVLAPLV	"+++"
91	RLPDIPLRQV	"+++"
92	RLPPDTLLQQV	"+++"
93	RLYTMDGITV	"++"
94	RMSDVVKGV	"+++"
95	SICNGVPMV	"+++"
96	SLLEEPNVIRV	"++++"
97	SLLPQLIEV	"++++"
98	SLLSPEHLQYL	"+++"
99	SLSAFLPSL	"++++"
100	SLVGDIGNVNM	"++"
101	SLWEGGVRGV	"+++"
102	SLWSVARGV	"+++"
103	SMGDHLWVA	"+++"
104	SVWFGPKEV	"+++"
105	SVYDGKLLI	"++++"
106	TLAAIIHGA	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
107	TLGQFYQEV	"++++"
108	TLLKKISEA	"+++"
109	TLYALSHAV	"+++"
110	TVGGSEILFEV	"++++"
111	TVMDIDTSGTFNV	"+++"
112	VLGEVKVGV	"++++"
113	VLMDKLVEL	"++++"
114	VLSQVYSKV	"+++"
115	VVLDDKDYFL	"+++"
116	WVIPAISAV	"++++"
117	YAFPKSITV	"+++"
118	YLDDEKNWGL	"+++"
119	YLDKNLTVSV	"+++"
120	YLGEEYVKA	"++"
121	YLITGNLEKL	"+++"
122	YLSQAADGAKVL	"++"
123	YLWDLDHGFAGV	"+++"
124	LLIDVVTYL	"++++"
125	ALYGRLEVV	"++++"
126	TLLDSPIKV	"+++"
127	VLIGSNHSL	"++++"
128	GLAFSLNGV	"++++"
129	SQADVIPAV	"+++"
130	ALDAGAVYTL	"++++"
131	ALDSGAFQSV	"+++"
132	ALHEEVVGV	"+++"
133	ALLEMDARL	"+++"
134	ALLETNPYLL	"++++"
135	ALLGKIEKV	"+++"
136	ALLNQHYQV	"+++"
137	ALPTVLVGV	"++++"
138	ALSQVTLLL	"++++"
139	ALSSKPAEV	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
140	ALTSISAGV	"++++"
141	AMGEKSFSV	"++++"
142	AVIGGLIYV	"++++"
145	FLIAEYFEHV	"++"
146	FLWTEQAHTV	"++"
147	GLAPGGLAVV	"+++"
148	GLFAPLVFL	"++++"
149	GLLSGLDIMEV	"++++"
150	GLSNLGIKSI	"++++"
151	HLAKVTAEV	"+++"
152	KLDNNLDSV	"+++"
154	KLTDHLKYV	"+++"
156	LLFPHPVNQV	"++++"
157	QLLPNLRAV	"+++"
158	RIISGLVKV	"++"
159	RLFPDGIVTV	"+++"
160	RLLAKIICL	"++"
161	RLLDEQFAV	"+++"
162	RLMSALTQV-	"++"
163	RLTESVLYL	"+++"
164	RMLIKLLEV	"+++"
165	RVIEHVEQV	"++++"
166	SILDIVTKV	"+++"
167	SLAESSFDV	"+++"
168	SLAVLVPIV	"+++"
169	SLFEWFHPL	"+++"
170	SLHNGVIQL	"+++"
171	SLIPAVLTV	"+++"
172	SLLNFLQHL	"+++"
173	SLTSEIHFL	"+++"
174	TLAELGAVQV	"+++"
175	TLFEHLPHI	"+++"
176	TLGQIWDV	"++++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
177	VLDEPYEKV	"+++"
178	YIFTTPKSV	"+++"
179	YIHNILYEV	"++++"
180	YLGPHIASVTL	"+++"
181	YLLEKFVAV	"+++"
182	YLLHFPMAL	"+++"
183	YLYNNEEQVGL	"++"
184	VVLDGGQIVTV	"+++"
185	ALFPALRPGGFQA	"+++"
186	VLLAQIIQV	"+++"
187	SYPTFFPRF	"++++"
188	RYSAGWDAKF	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+++"
190	RYNEKCFKL	"++++"
191	KYPDIISRI	"++++"
192	SYITKPEKW	"++++"
193	IYPGAFVDL	"++++"
195	RYAPPPSFSEF	"++++"
196	AYLKWISQI	"++++"
197	RWPKKSAEF	"++++"
198	LYWSHPRKF	"++++"
199	KFVTVQATF	"++++"
200	AYLLQPSQF	"++++"
201	AYVNTFHNI	"++++"
202	AYGTYRSNF	"++++"
203	YYGILQEKI	"++++"
205	VYGLQRNLL	"++++"
206	KWPETPLLL	"++++"
207	IYLERFPIF	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"++++"
209	VFHPRQELI	"+++"
210	AYPAIRYLL	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
212	VYGDVISNI	"++++"
213	YYNKVSTVF	"++++"
214	IYVTSIEQI	"++++"
215	IYTGNISSF	"++++"
216	IYADVGEEF	"++++"
217	DYIPYVFKL	"++++"
218	VYQGAIRQI	"++++"
219	GVMAGDIYSV	"++++"
220	SLLEKELESV	"+++"
221	ALCEENMRGV	"+++"
222	LTDITKGV	"++"
223	FLFNTENKLLL	"++++"
224	ALASVIKEL	"+++"
225	KMDPVAYRV	"+++"
226	AVLGPLGLQEV	"+++"
227	ALLKVNQEL	"++++"
228	YLITSVELL	"++++"
229	KMFESFIESV	"+++"
230	VLTEFTREV	"++++"
231	RLFNDPVAMV	"++++"
232	KLAEIVKQV	"++++"
233	ALLGKLDAI	"++++"
234	YLEPYLKEV	"++++"
235	KLFEEIREI	"++++"
236	ALADKELLPSV	"+++"
237	ALRGEIETV	"+++"
238	AMPPPPPQGV	"++"
239	FLLGFIPAKA	"+++"
240	FLWERPTLLV	"+++"
241	FVLPLLGLHEA	"++"
242	GLFAPVHKV	"+++"
243	GLLDNPELRV	"+++"
244	KIAELLENV	"++++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
245	KLGAVFNQV	"++++"
246	KLISSYYNV	"+++"
247	KLLDTMVDTFL	"++++"
248	KLNDLIQRL	"+++"
249	LLLGERVAL	"++++"
250	NLAEVVERV	"++++"
251	RLFADILNDV	"++++"
252	RTIEYLEEV	"+++"
253	RVPPPPQSV	"++"
254	RVQEAIAEV	"+++"
255	SLFGQDVKAV	"+++"
256	SLFQGVEFHYV	"+++"
257	SLLEKAGPEL	"+++"
258	SLMGPVVHEV	"+++"
259	TLITDGMRSV-	"++"
260	TLMDMRLSQV	"+++"
261	VLFQEALWHV	"+++"
262	VLPNFLPYNV	"+++"
263	VLYPSLKEI	"+++"
264	VMQDPEFLQSV	"++++"
265	WLIEDGKVVTV	"++++"
266	SLLESNKDLLL	"+++"
267	ALNENINQV	"+++"
268	KLYQEVEIASV	"++++"
269	YLMEGSYNKV	"+++"
270	SVLDQKILL	"+++"
271	LLLDKLILL	"++++"
272	QQLDSKFLEQV	"+++"
273	AILETAPKEV	"+++"
274	ALAEALKEV	"++++"
275	ALIEGAGILL	"+++"
276	ALLEADVNIKL	"++++"
277	ALLEENSTPQL	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Intercambio del péptido
278	ALTSVVVTL	"++++"
279	ALWTGMHTI	"+++"
280	ATLNIIHSV	"+++"
281	GLLAGDRLVEV	"+++"
282	GQFPSYLETV	"+++"
283	ILSGIGVSQV	"+++"
284	KLDAFVEGV	"+++"
285	KLLDLSDSTSV	"+++"
286	KVLDKVFRA	"++++"
287	LIGEFLEKV	"++++"
288	LLDDSLVSI	"+++"
290	NLIDLDDLYV	"++++"
291	QLIDYERQL	"+++"
292	RIPAYFVTV	"++"
293	FLASESLIKQI	"++"
294	RLIDLHTNV	"++++"
295	SLFSSPPEI	"+++"
296	SLLSGRISTL	"+++"
297	TLFYSLREV	"+++"
298	TMAKESSIIGV	"++"
299	ALLRVTPFI	"+++"
300	TLAQQPTAV	"++"
302	KIQEILTQV	"++++"

Ejemplo 4

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP desvelados, 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 22 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la invención, lo cual demuestra que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (Tabla 10).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, los inventores primero aislaron linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A*02 por selección positiva con microperlas de CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de donantes sanos obtenidas de la Clínica universitaria de Mannheim, Alemania, tras el preceptivo consentimiento informado. Los linfocitos CD8+ o PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM)

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

La fabricación de las microperlas tapizadas con pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y la lectura se llevaron a cabo en un sistema *in vitro* muy definido con cuatro moléculas pMHC distintas en cada condición de estimulación y 8 moléculas pMHC distintas en cada condición de lectura.

El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung y col., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 µm de diámetro recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE.UU.).

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

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 µl en presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadió 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente $1x10^6$ linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen y col., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con anticuerpo anti-CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSRII SORP con los filtros y láseres adecuados. Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de CHC

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de tres péptidos desvelados tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 22 péptidos desvelados se resumen en la Tabla 11A.

Tabla 11A: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I desvelados

Resultados ilustrativos de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos desvelados. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 % = ++++			
SEQ ID	ID del péptido	Pocillos	Donantes
225	QAR-001	+++	++++
1	APOB-003	++	++++
2	ALDH1L1-001	++	++++
301	C1QTNF3-001	++	++++
15	SLC35B2-001	++	++++
16	ACSL3-001	++	++++

(continuación)

SEQ ID	ID del péptido	Pocillos	Donantes
12	GPC3-001	+	++++
7	APOB-002	+	++++
303	MAGEB2-001	+	++
227	SAMM-001	+	+++
4	APOB-004	+	++++
226	THT-001	+	++++
6	AXIN2-001	+	++
232	MAPKAPK5-001	+	+++
10	USO-001	+	++
304	USP14-001	+	++++
219	ADF-012	+	++++
224	IFT81-001	+	+++
11	ZNF318-001	+	++
14	NCST-001	+	++
228	ACSL4-001	+	++
230	IPO9-001	+	++++

Tabla 11B: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos HLA de clase I adicionales desvelados

Resultados ilustrativos de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante con los péptidos restringidos a HLA-A*24 desvelados. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad en condiciones *in vitro*. Se resume el porcentaje de pocillos y de donantes positivos (entre los evaluables), indicados del modo siguiente: 1% a 20% = +; 20% a 49% = ++; 50% a 69%= +++; >= 70%= ++++.			
SEQ ID NO.	**Secuencia**	**Pocillos positivos [%]**	**Donantes positivos [%]**
187	SYPTFFPRF	"+"	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+"	"++"
190	RYNEKCFKL	"+"	"++"
191	KYPDIISRI	"+"	"++++"
192	SYITKPEKW	"+"	"+++"
193	IYPGAFVDL	"+"	"+++"
194	QYASRFVQL	"+"	"+++"

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia	Pocillos positivos [%]	Donantes positivos [%]
196	AYLKWISQI	"+"	"+++"
197	RWPKKSAEF	"+"	"++"
198	LYWSHPRKF	"+"	"++"
199	KFVTVQATF	"+"	"++"
201	AYVNTFHNI	"++"	"++++"
202	AYGTYRSNF	"+"	"++++"
203	YYGILQEKI	"+"	"+++"
205	VYGLQRNLL	"+"	"+++"
207	IYLERFPIF	"++"	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"+"	"+++"
209	VFHPRQELI	"++"	"++++"
210	AYPAIRYLL	"+"	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++"	"++++"
212	VYGDVISNI	"+"	"++++"
215	IYTGNISSF	"+"	"++"
216	IYADVGEEF	"+"	"++"
217	DYIPYVFKL	"+++"	"++++"
218	VYQGAIRQI	"+"	"+++"

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

Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido IMA-APOB-002 (SEQ ID NO. 7) (A, recuadro derecho) o el péptido IMA-APOB-003 (B, recuadro derecho, SEQ ID NO. 1), o el péptido IMA- ALDH1L1-001 (C, recuadro derecho, SEQ ID NO. 2) respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros con A*02/ APOB-002 (A) o A*02/ APOB-003 (B), o A*02/ALDH1L1-001. Los recuadros de la izquierda (A, B, C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*24/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

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

Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*24 formando un complejo con el péptido IMA-KLHL24-001 (SEQ ID NO. 190) (A, recuadro izquierdo) o el péptido IMA-APOB-006 (B, recuadro izquierdo, SEQ ID NO. 218), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros con A*24/ KLHL24-001 (A) o A*24/ APOB-006 (B). Los recuadros de la izquierda (A y B) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*24/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

Ejemplo 5: Síntesis de péptidos

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

Lista de referencias bibliográficas

Adler, A. S. y col., Genes Dev. **28** (2014)
Ahn, Y. H. y col., J Proteomics. **106** (2014)
Akiyama, H. y col., Oncol Rep. **21** (2009)
Alam, S. M. y col., Endocr.Relat Cancer **16** (2009)
Aleman, G. y col., Am J Physiol Endocrinol.Metab **289** (2005)
Alexanian, A. y col., Cancer Genomics Proteomics. **9** (2012)
Altenhofer, S. y col., J Biol.Chem. **285** (2010)
Alvarez, C. y col., J Biol.Chem. **276** (2001)
Ammerpohl, O. y col., Int.J Cancer **130** (2012)
Andersen, R. S. y col., Nat.Protoc. **7** (2012)
Arai, E. y col., Carcinogenesis **33** (2012)
Araki, T. y col., J Biol.Chem. **286** (2011)
Arlt, A. y col., Oncogene **28** (2009)
Arndt, S. y col., Oncol Rep. **18** (2007)
Arner, E. S. y col., Eur.J Biochem. **267** (2000)
Atienza, J. M. y col., Mol Cancer Ther **4** (2005)
Avery-Kiejda, K. A. y col., BMC.Cancer **14** (2014)
Bachmann, S. B. y col., Mol Cancer **13** (2014)
Balogh, K. y col., Oncogene **31** (2012)
Bani, M. R. y col., Mol Cancer Ther **3** (2004)
Bansal, N. y col., PLoS.One. **6** (2011)
Barbarulo, A. y col., Oncogene **32** (2013)
Bell, J. C. y col., Drug Metab Dispos. **40** (2012)
Ben-Izhak, O. y col., Histopathology **41** (2002)
Bergada, L. y col., Lab Invest **94** (2014)
Bergeron, M. J. y col., Mol Aspects Med. **34** (2013)
Bhattacharya, C. y col., Mol Cancer **11** (2012)
Bhogaraju, S. y col., Science **341** (2013)
Bidkhori, G. y col., PLoS.One. **8** (2013)
Bieche, I. y col., Breast Cancer Res **6** (2004)
Biswas, S. y col., Biochim.Biophys.Acta **1832** (2013)
Blanke, K. L. y col., Cancer Causes Control **25** (2014)
Bodine, S. C. y col., Science **294** (2001)
Boehringer, J. y col., Biochem.J **448** (2012)
Bojjireddy, N. y col., J Cell Sci. (2014)
Booth, D. G. y col., EMBO J **30** (2011)
Bouquet, C. y col., Mol Ther **14** (2006)
Boylan, K. L. y col., Proteome.Sci. **8** (2010)
Braumuller, H. y col., Nature (2013)
Brockmoller, S. F. y col., J Proteome.Res **11** (2012)
Buch, S. C. y col., Mol Carcinog. **51 Suppl 1** (2012)
Bull, C. y col., Cancer Res **74** (2014)
Burrell, R. A. y col., Nature **494** (2013)
Butterfield, L. H. y col., Clin Cancer Res **12** (2006)
Butterfield, L. H. y col., Clin.Cancer Res. **9** (2003)
Byrne, A. y col., Exp.Cell Res **316** (2010)
Cadenas, C. y col., Cell Cycle **13** (2014)
Cadoret, A. y col., Oncogene **21** (2002)
Cao, H. y col., Biochemistry **41** (2002)
Cao, Y. y col., Cancer Research **61** (2001)
Cao-Ehlker, X. y col., J Biol.Chem. **288** (2013)
Carroll, M. y col., J Interferon Cytokine Res **33** (2013)
Carrouel, F. y col., J Dent.Res **87** (2008)
Castro, M. y col., J Transl.Med. **8** (2010)
Chae, Y. S. y col., Med.Oncol **28** (2011)
Chang, L. O. y col., Cancer Res **33** (1973)
Chang, Y. S. y col., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007)
Chapiro, J. y col., Radiol.Med. **119** (2014)

Charbonneau, B. y col., Am J Hematol. **87** (2012)
Chatterjee, M. y col., Haematologica **98** (2013)
Chen, J. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **420** (2012a)
Chen, M. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **108** (2011a)
Chen, R. y col., World J Gastroenterol. **17** (2011b)
Chen, X. y col., J Dig.Dis. **12** (2011c)
Chen, X. Q. y col., Med.Oncol **29** (2012b)
Cheng, L. y col., Genomics **102** (2013)
Choi, Y. W. y col., Int.J Gynecol.Cancer **17** (2007)
Christa, L. y col., Gastroenterology **106** (1994)
Clark, A. G. y col., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012)
Claro da, Silva T. y col., Mol.Aspects Med. **34** (2013)
Cohen, L. y col., Nature **395** (1998)
Collins, C. L. y col., Surgery **122** (1997)
Com, E. y col., J Proteomics. **75** (2012)
Copps, K. D. y col., Diabetologia **55** (2012)
Cornen, S. y col., PLoS.ONE. **9** (2014)
Cornez, I. y col., Biochem.Pharmacol. **75** (2008)
Cowling, V. H., Oncogene **29** (2010)
Cui, T. y col., Int.J Oncol **39** (2011)
da Silva, M. G. y col., Exp.Clin Cardiol. **17** (2012)
Dadkhah, E. y col., Arch.Iran Med. **16** (2013)
Darmanis, S. y col., PLoS.One. **8** (2013)
Darvekar, S. y col., Biochem.J **442** (2012)
Darvekar, S. R. y col., PLoS.One. **9** (2014)
Datta, K. y col., J Biol.Chem. **284** (2009)
David, S. y col., Front Biosci.(Elite.Ed) **5** (2013)
de Almagro, M. C. y col., Biochem.Pharmacol. **81** (2011)
de Groot, J. F. y col., Cancer Res **65** (2005)
Deb, S. y col., Br.J Cancer **110** (2014)
Debauve, G. y col., Cell Mol Life Sci. **65** (2008)
Decker, T. y col., J Clin Invest **109** (2002)
Decock, A. y col., Genome Biol. **13** (2012)
Del Campo, E. M. y col., Mol Phylogenet.Evol. **66** (2013)
Delaval, B. y col., J Cell Biol. **188** (2010)
Deng, X. D. y col., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014)
Di, Gregorio E. y col., J Med.Genet. **50** (2013)
Diggle, C. P. y col., PLoS.Genet. **10** (2014)
Dimitrov, A. y col., Hum.Mol Genet. **18** (2009)
Dmitriev, O. Y., Biochem.Cell Biol. **89** (2011)
Doherty, J. A. y col., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011)
Dong, Z. y col., Crit Rev.Oncol Hematol. **59** (2006)
Dou, R. y col., Cancer Lett. **336** (2013)
Drazkowska, K. y col., Nucleic Acids Res **41** (2013)
Edavana, V. K. y col., Drug Metab Dispos. **41** (2013)
Edwards, P. A. y col., Breast Cancer Res **14** (2012)
Elvenes, J. y col., PLoS.One. **6** (2011)
Emaduddin, M. y col., Cell Commun.Signal. **6** (2008)
Enguita-German, M. y col., World J Hepatol. **6** (2014)
Epelbaum, R. y col., Pathol.Oncol Res **4** (1998)
Fan, T. W. y col., Mol Cancer **8** (2009)
Fang, Z. Q. y col., Genet.Mol Res **12** (2013)
Fassas, A. B. y col., Leuk.Lymphoma **45** (2004)
Feferman, L. y col., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **16** (2013)
Fei, F. y col., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)
Fei, F. y col., Ann Surg.Oncol **21** (2014b)
Feigelson, H. S. y col., Breast Cancer Res **10** (2008)
Feng, L. y col., Cell Biochem.Funct. **29** (2011)
Feng, M. y col., J Clin Invest **124** (2014a)
Feng, S. y col., Int.J Biol.Sci. **9** (2013)
Feng, Y. y col., J Biol.Chem. **289** (2014b)
Feng, Y. y col., Free Radic.Res **46** (2012)
Fernandes, C. F. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **361** (2007)
Ferre, S. y col., J Am Soc Nephrol. **25** (2014)
Ferrer-Ferrer, M. y col., Arch.Med.Res **44** (2013)
Filmus, J. y col., FEBS J **280** (2013)

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

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

Leasure, C. D. y col., Plant Physiol **150** (2009)
Lee, C. H. y col., Hum.Reprod. **24** (2009)
Lee, K. W. y col., J Biol.Chem. **288** (2013)
Lee, S. J. y col., Toxicol.Lett. (2014)
Lee, W. C. y col., J Immunother. **28** (2005)
Lee, Y. C. y col., Int.J Cancer **122** (2008)
Lekva, T. y col., PLoS.One. **8** (2013)
LeRoy, P. J. y col., Cancer Res **67** (2007)
Leung, T. y col., Breast Cancer Res **15** (2013)
Levenson, V. V. y col., Somat.Cell Mol Genet. **25** (1999)
Levi, S. y col., Front Pharmacol. **5** (2014)
Li, D. y col., Protein Cell **5** (2014a)
Li, N. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **455** (2014)
Li, X. y col., Med.Oncol **31** (2014b)
Li, Y. y col., Mol Cell Biol. **29** (2009)
Li, Y. H. y col., World J Gastroenterol. **18** (2012)
Liang, J. y col., PLoS.One. **3** (2008)
Lillig, C. H. y col., Antioxid.Redox.Signal. **9** (2007)
Lin, C. H. y col., J Cell Biol. **189** (2010)
Lin, M. C. y col., Oral Oncol **50** (2014)
Lin, S. H. y col., Oncogene **23** (2004)
Lin, Z. y col., Cell Rep. **5** (2013)
Linderoth, J. y col., Br.J Haematol. **141** (2008)
Line, A. y col., Cancer Immunol Immunother. **51** (2002)
Ling, C. y col., EMBO J **26** (2007)
Linge, A. y col., J Proteome.Res **13** (2014)
Lioutas, A. y col., EMBO Rep. **14** (2013)
Liu, C. y col., Nat Med. **20** (2014)
Liu, C. y col., J Natl.Cancer Inst. **105** (2013a)
Liu, H. y col., Carcinogenesis **34** (2013b)
Liu, T. W. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106** (2009a)
Liu, W. y col., J Biol.Chem. **279** (2004)
Liu, Y. y col., Curr.Drug Targets. **13** (2012)
Liu, Y. y col., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **18** (2009b)
Liu, Y. y col., Oncol Rep. **18** (2007)
Ljungberg, B., Curr.Opin.Urol. **17** (2007)
Llovet, J. M. y col., N.Engl.J Med. **359** (2008)
Lo Re, A. E. y col., J Biol.Chem. **287** (2012)
Lo, W. Y. y col., J Proteome.Res **6** (2007)
Lombardo, Y. y col., Breast Cancer Res **16** (2014)
Lourenco, G. J. y col., Breast Cancer Res Treat. **100** (2006)
Lovelace, L. L. y col., J Biol.Chem. **286** (2011)
Lung, H. L. y col., Int J Cancer **127** (2010)
Lutcke, H., Eur.J Biochem. **228** (1995)
Ma, X. J. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003)
Mackiewicz, A. y col., Glycoconj.J **12** (1995)
Mahajan, K. y col., Cancer Lett. **338** (2013)
Mamtani, M. y col., BMC.Res Notes **5** (2012)
Mariani, L. y col., Clin Cancer Res **7** (2001)
Marina, M. y col., Front Biosci.(Landmark.Ed) **19** (2014)
Markiewski, M. M. y col., Nat Immunol **9** (2008)
Martin, T. A. y col., Eur.J Cancer **40** (2004)
Martinez, H. D. y col., Genes Cancer **2** (2011)
Mathison, J. y col., Pathobiology **59** (1991)
Matsubara, J. y col., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011)
Matusiak, D. y col., J Histochem.Cytochem. **55** (2007)
McGuire, T. A., Md Med.J **40** (1991)
Medjkane, S. y col., Cell Cycle **11** (2012)
Meijers, J. C. y col., Br.J Haematol. **108** (2000)
Mercer, C. A. y col., Autophagy. **5** (2009)
Mercurio, F. A. y col., Biochemistry **51** (2012)
Midorikawa, Y. y col., Jpn.J Cancer Res. **93** (2002)
Miled, C. y col., Cancer Res **65** (2005)
Milkereit, P. y col., J Biol.Chem. **278** (2003)
Miller, J. C. y col., Mol Carcinog. **48** (2009)
Mohelnikova-Duchonova, B. y col., Pancreas **42** (2013)

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

Riihila, P. M. y col., J Invest Dermatol. **134** (2014)
Rodriguez, F. J. y col., J Neuropathol.Exp.Neurol. **67** (2008)
Rogov, V. y col., Mol Cell **53** (2014)
Romanuik, T. L. y col., BMC.Genomics **10** (2009)
Roodman, G. D., Ann N.Y.Acad.Sci. **1192** (2010)
Rosado, I. V. y col., RNA. **10** (2004)
Rose, A. E. y col., Cancer Res **71** (2011)
Ross, H. y col., Arch.Pathol.Lab Med. **136** (2012)
Rossi, M. R. y col., Cancer Genet.Cytogenet. **161** (2005)
Rotondo, R. y col., Int.J Cancer **125** (2009)
Rucksaken, R. y col., Cancer Biomark. **12** (2012)
Ruiz, F. X. y col., Biochem.J **440** (2011)
Ruiz, F. X. y col., Front Pharmacol. **3** (2012)
Rutkowski, M. J. y col., Mol Cancer Res **8** (2010)
Rylova, S. N. y col., Cancer Res **62** (2002)
Sahm, F. y col., Cancer Res **73** (2013)
Sahu, A. y col., Immunol Res **17** (1998)
Saito, T. y col., J Biol.Chem. **278** (2003)
Salahshor, S. y col., J Clin Pathol. **58** (2005)
Sang, W. y col., Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi. **42** (2013)
Sangro, B. y col., J Clin Oncol **22** (2004)
Sanz, L. y col., Mol Cell Biol. **15** (1995)
Saponaro, C. y col., Cancer Biomark. **14** (2014)
Sarajlic, A. y col., Breast Cancer Res Treat. **143** (2014)
Sasahira, T. y col., Eur.J Cancer **50** (2014)
Schneider, E. y col., Clin Chim.Acta **374** (2006)
Schofield, A. V. y col., Crit Rev.Biochem.Mol Biol. **48** (2013)
Schulz, E. G. y col., Immunity. **30** (2009)
Seifert, M. y col., J Pathol. **205** (2005)
Senchenko, V. y col., Oncogene **22** (2003)
Shaughnessy, J. D., Jr. y col., Blood **118** (2011)
Shen, F. y col., J Cell Biochem. **112** (2011)
Shi, M. y col., World J Gastroenterol. **10** (2004a)
Shi, Y. y col., Exp.Cell Res **296** (2004b)
Shi, Z. Z. y col., Clin Transl.Oncol **16** (2014)
Shinji, S. y col., Oncol Rep. **15** (2006)
Shodeinde, A. y col., J Mol Biochem. **2** (2013)
Shubbar, E. y col., BMC.Cancer **13** (2013)
Shurbaji, M. S. y col., Am J Clin Pathol. **96** (1991)
Sillars-Hardebol, A. H. y col., Gut **61** (2012)
Singh, S. y col., Tumour.Biol. (2014)
Smith, P. y col., Clin Cancer Res **13** (2007)
Song, C. y col., J Biol.Chem. **288** (2013)
Srivenugopal, K. S. y col., Cancer Lett. **117** (1997)
Staal-van den Brekel AJ y col., Br.J Cancer **76** (1997)
Steen, H. C. y col., J Interferon Cytokine Res. **32** (2012)
Stefanska, B. y col., Clin Cancer Res **20** (2014)
Strassburg, C. P. y col., J Biol.Chem. **273** (1998)
Strassburg, C. P. y col., Mol Pharmacol. **52** (1997)
Sudo, H. y col., Genomics **95** (2010)
Sugihara, T. y col., J Biol.Chem. **276** (2001)
Sun, C. y col., Pathol.Res Pract. **210** (2014)
Sun, X. y col., J Pathol. **226** (2012)
Sun, X. y col., Protein Cell **4** (2013)
Sun, X. J. y col., Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi. **22** (2005)
Supernat, A. y col., Oncol Lett. **4** (2012)
Surmacz, E., J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia. **18** (2013)
Suzuki, K. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **368** (2008)
Swallow, C. J. y col., Oncogene **24** (2005)
Tabuchi, K. y col., J Neurosci. **22** (2002)
Taguchi, O. y col., Clin Chim.Acta **244** (1996)
Takayama, T. y col., Cancer **68** (1991)
Takayama, T. y col., Lancet **356** (2000)
Takeda, Y. y col., Glycobiology **24** (2014)
Takemasa, I. y col., Int.J Oncol **40** (2012)
Takeuchi, A. y col., Mol Cell Endocrinol. **384** (2014)

Tan, L. Z. y col., Am J Pathol. **183** (2013)
Tan, M. K. y col., Mol Cell Biol. **31** (2011)
Tanahashi, N. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **243** (1998)
Tanaka, M. y col., Mol Med.Rep. **7** (2013)
Tang, L. y col., Arch.Med.Res **43** (2012)
Tang, X. H. y col., Annu.Rev.Pathol. **6** (2011)
Tao, J. y col., Sci.Transl.Med. **3** (2011)
Tao, R. H. y col., Biochem.Biophys.Res Commun. **341** (2006)
Tao, T. y col., Cell Res **23** (2013)
Tarao, K. y col., Cancer **86** (1999)
Tarao, K. y col., Cancer **79** (1997)
Tasker, P. N. y col., Osteoporos.Int. **17** (2006)
Telikicherla, D. y col., Clin Proteomics. **9** (2012)
Tian, T. y col., Eur.J Cancer **48** (2012)
Tian, Y. y col., BMC.Cancer **14** (2014)
Tomiyama, K. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **107** (2010)
Tomoda, T. y col., J Gastroenterol.Hepatol. **27** (2012)
Tong, J. y col., PLoS.One. **8** (2013)
Tortorella, S. y col., J Membr.Biol. **247** (2014)
Tran, E. y col., Science **344** (2014)
Trougakos, I. P., Gerontology **59** (2013)
Tsai, H. Y. y col., Oncogene **32** (2013)
Uddin, S. y col., Int.J Clin Exp.Pathol. **4** (2011)
Uehara, Y. y col., Cancer Res **43** (1983)
Urig, S. y col., Semin.Cancer Biol. **16** (2006)
Vainio, P. y col., Am.J Pathol. **178** (2011)
van der Spek, P. J. y col., Genomics **31** (1996)
van Zuylen, W. J. y col., PLoS.Pathog. **8** (2012)
van, den Broek, I y col., Proteomics.Clin Appl. **4** (2010)
van, Duin M. y col., Haematologica **96** (2011)
Vejda, S. y col., Mol Cell Proteomics. **1** (2002)
Vincent, F. y col., Cancer Res **69** (2009)
Wang, B. S. y col., Cell Stress.Chaperones. **18** (2013a)
Wang, D. y col., J Biol.Chem. **277** (2002)
Wang, J. y col., Eur.J Cancer Prev. **22** (2013b)
Wang, J. y col., J Clin Invest **112** (2003)
Wang, J. y col., Cancer Prev.Res (Phila) **6** (2013c)
Wang, J. C. y col., Oncology **81** (2011)
Wang, M. y col., Chin J Physiol **55** (2012)
Wang, S. K. y col., PLoS.Genet. **9** (2013d)
Wang, S. S. y col., PLoS.One. **5** (2010)
Wang, X. y col., Urol.Int. **92** (2014)
Wang, Y. y col., J Biol.Chem. **274** (1999)
Wang, Y. y col., Med.Oncol **32** (2015)
Wazir, U. y col., Cell Mol Biol.Lett. **18** (2013)
Wazir, U. y col., Anticancer Res **32** (2012)
Weiss, J. y col., Int.J Antimicrob.Agents **41** (2013)
Welsh, M. M. y col., Carcinogenesis **29** (2008)
Wieser, R., Leuk.Lymphoma **43** (2002)
Wilhelm, S. M. y col., Cancer Res. **64** (2004)
Williams, A. L. y col., Nature **506** (2014)
Witte, I. y col., Cell Death.Dis. **2** (2011)
Wong, K. K. y col., Leukemia **28** (2014)
Wong, N. y col., J Hepatol. **38** (2003)
Wu, L. y col., Ann Hematol. **91** (2012)
Wu, N. y col., Int.J Mol Sci. **14** (2013a)
Wu, W. y col., Sci.China Life Sci. **56** (2013b)
Wu, X. y col., Am.J Clin Exp.Urol. **2** (2014)
Wu, Y. M. y col., Cancer Res **71** (2011)
Xiao, J. y col., J Biol.Chem. **276** (2001)
Xie, F. W. y col., Neoplasma **61** (2014)
Xu, H. y col., Cell Rep. **9** (2014)
Xu, X. y col., Proteomics. **10** (2010)
Yan, D. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001)
Yang, C. y col., Virchows Arch. **463** (2013)
Yang, C. Y. y col., J Immunol **192** (2014a)

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Nuevos péptidos y nueva combinación de péptidos para su uso en inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer

<130> I32728WO

<150> GB1423016.3
<151> 23-12-2014

<150> US62/096.165

<151> 23-12-2014

<150> GB1501017.6
<151> 21-01-2015

<160> 348

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Val Met Ala Pro Phe Thr Met Thr Ile
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Lys Leu Gln Ala Gly Thr Val Phe Val
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ile Leu Asp Asp Asn Met Gln Lys Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu
1 5

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

<400> 5

Ala Leu Val Glu Gln Gly Phe Thr Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Lys Leu Ser Pro Thr Val Val Gly Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

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

<400> 9

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

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

<400> 10

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

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ser Leu Ser Gln Glu Leu Val Gly Val
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu
1 5

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

<400> 13

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

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

<400> 14

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

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

<400> 15

Leu Leu Tyr Gly His Thr Val Thr Val
1 5

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

<400> 16

Ser Leu Leu Gly Gly Asn Ile Arg Leu
1 5

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

<400> 17

Arg Val Ala Ser Pro Thr Ser Gly Val
1 5

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

<400> 18

Ala Leu Tyr Gly Lys Thr Glu Val Val
1 5

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

<400> 19

Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val
1 5

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

<400> 20

Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val
1 5

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

<400> 21

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

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

<400> 22

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

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

<400> 23

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

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

<400> 24

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

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

<400> 25

Ser Leu Asp Gly Lys Ala Ala Leu Thr Glu Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ser Leu Leu His Thr Ile Tyr Glu Val
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Thr Leu Pro Asp Phe Arg Leu Pro Glu Ile
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu
1 5

<210> 29
<211> 9

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn Thr Ile
1 5

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

<400> 30

Tyr Leu Gly Glu Gly Pro Arg Met Val
1 5

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

<400> 31

Tyr Gln Met Asp Ile Gln Gln Glu Leu
1 5

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

<400> 32

Ala Leu Asn Ala Val Arg Leu Leu Val
1 5

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

<400> 33

Leu Leu His Gly His Ile Val Glu Leu
1 5

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

<400> 34

Ser Leu Ala Glu Gly Thr Ala Thr Val
1 5

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

<400> 35

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

<210> 36
<211> 10

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

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

<400> 37

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

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

<400> 38

Ala Leu Ala Asp Val Val His Glu Ala
1 5

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

<400> 39

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

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

<400> 40

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

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

<400> 41

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

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

<400> 42

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

<210> 43

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

<400> 43

Ala Leu Leu Gly Val Trp Thr Ser Val
1 5

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

<400> 44

Ala Leu Gln Asp Ala Ile Arg Gln Leu

1 5

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

<400> 45

Ala Leu Gln Asp Gln Leu Val Leu Val
1 5

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

<400> 46

Ala Met Ala Glu Met Lys Val Val Leu
1 5

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

<400> 47

Phe Leu Asp Thr Pro Ile Ala Lys Val
1 5

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

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

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

<400> 49

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

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

<400> 50

Phe Thr Ile Pro Lys Leu Tyr Gln Leu
1 5

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

<400> 51

Gly Leu Ala Glu Glu Leu Val Arg Ala
1 5

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

<400> 52

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

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

<400> 53

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

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

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

<400> 55

Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu
1 5

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

<400> 56

Gly Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Val
1 5

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

<400> 57

His Leu Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val
1 5

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

<400> 58

Ile Leu Ala Asp Leu Asn Leu Ser Val
1 5

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

<400> 59

Ile Leu Ala Asp Thr Phe Ile Gly Val
1 5

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

<400> 60

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu
1 5

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

<400> 61

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

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

<400> 62

Lys Ile Ala Gly Thr Asn Ala Glu Val
1 5

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

<400> 63

Lys Ile Asp Glu Lys Asn Phe Val Val
1 5

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

<400> 64

Lys Ile Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Val
1 5

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

<400> 65

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

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

<400> 66

Lys Leu His Glu Glu Ile Asp Arg Val
1 5

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

<400> 67

Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu
1 5

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

<400> 68

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

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

<400> 69

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

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

<400> 70

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

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

<400> 71

Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Lys Leu Ser Glu Ala Val Thr Ser Val
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Lys Leu Thr Leu Val Ile Ile Ser Val
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Lys Leu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Val
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Lys Gln Met Glu Pro Leu His Ala Val
1 5

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

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

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Leu Leu His Glu Glu Asn Phe Ser Val
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

Leu Leu Ile Asp Asp Glu Tyr Lys Val
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Leu Leu Leu Ser Thr Gly Tyr Glu Ala
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Leu Leu Tyr Glu Gly Lys Leu Thr Leu
1 5

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 81

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

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 82

Asn Val Phe Asp Gly Leu Val Arg Val
1 5

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

<400> 83

Gln Leu His Asp Phe Val Met Ser Leu
1 5

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

<400> 84

Gln Leu Thr Pro Val Leu Val Ser Val
1 5

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

<400> 85

Arg Ile Leu Pro Lys Val Leu Glu Val
1 5

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

<400> 86

Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Val
1 5

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

<400> 87

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

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

<400> 88

Arg Leu Ile Asp Arg Ile Lys Thr Val
1 5

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

<400> 89

Arg Leu Ile Glu Glu Ile Lys Asn Val
1 5

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

<400> 90

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

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

<400> 91

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

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

<400> 92

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

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

<400> 93

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

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

<400> 94

Arg Met Ser Asp Val Val Lys Gly Val
1 5

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

<400> 95

Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro Met Val
1 5

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

<400> 96

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

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

<400> 97

Ser Leu Leu Pro Gln Leu Ile Glu Val
1 5

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

<400> 98

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

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

<400> 99

Ser Leu Ser Ala Phe Leu Pro Ser Leu
1 5

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

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

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

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

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Ser Leu Trp Ser Val Ala Arg Gly Val
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Ser Val Trp Phe Gly Pro Lys Glu Val
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Ser Val Tyr Asp Gly Lys Leu Leu Ile
1 5

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

<400> 106

Thr Leu Ala Ala Ile Ile His Gly Ala
1 5

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

<400> 107

Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln Glu Val
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Thr Leu Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala
1 5

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

<400> 109

Thr Leu Tyr Ala Leu Ser His Ala Val
1 5

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

<400> 110

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

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

<400> 111

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

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

<400> 112

Val Leu Gly Glu Val Lys Val Gly Val
1 5

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

<400> 113

Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu
1 5

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

<400> 114

Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val
1 5

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

<400> 115

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

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

<400> 116

Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser Ala Val
1 5

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

<400> 117

Tyr Ala Phe Pro Lys Ser Ile Thr Val
1 5

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

<400> 118

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

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

<400> 119

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

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

<400> 120

Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala
1 5

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

<400> 121

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

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

<400> 122

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

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

<400> 123

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

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

<400> 124

Leu Leu Ile Asp Val Val Thr Tyr Leu
1 5

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

<400> 125

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
1 5

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

<400> 126

Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val
1 5

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

<400> 127

Val Leu Ile Gly Ser Asn His Ser Leu
1 5

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

<400> 128

Gly Leu Ala Phe Ser Leu Asn Gly Val
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 129

Ser Gln Ala Asp Val Ile Pro Ala Val
1 5

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

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

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

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

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

Ala Leu His Glu Glu Val Val Gly Val
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

Ala Leu Leu Glu Met Asp Ala Arg Leu
1 5

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

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

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

<400> 135

Ala Leu Leu Gly Lys Ile Glu Lys Val
1 5

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

<400> 136

Ala Leu Leu Asn Gln His Tyr Gln Val
1 5

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

<400> 137

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val
1 5

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

<400> 138

Ala Leu Ser Gln Val Thr Leu Leu Leu
1 5

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

<400> 139

Ala Leu Ser Ser Lys Pro Ala Glu Val
1 5

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

<400> 140

Ala Leu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Val
1 5

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

<400> 141

Ala Met Gly Glu Lys Ser Phe Ser Val
1 5

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

<400> 142

Ala Val Ile Gly Gly Leu Ile Tyr Val
1 5

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

<400> 143

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

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

<400> 144

Phe Ile Gln Leu Ile Thr Gly Val
1 5

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

<400> 145

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

<210> 146
<211> 10
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 146

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

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

<400> 147

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

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

<400> 148

Gly Leu Phe Ala Pro Leu Val Phe Leu
1 5

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

<400> 149

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

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

<400> 150

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

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

<400> 151

His Leu Ala Lys Val Thr Ala Glu Val
1 5

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

<400> 152

Lys Leu Asp Asn Asn Leu Asp Ser Val
1 5

<210> 153

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

<400> 153

Lys Leu Ile Glu Val Asn Glu Glu Leu
1 5

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

<400> 154

Lys Leu Thr Asp His Leu Lys Tyr Val
1 5

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

<400> 155

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

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

<400> 156

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

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

<400> 157

Gln Leu Leu Pro Asn Leu Arg Ala Val
1 5

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

<400> 158

Arg Ile Ile Ser Gly Leu Val Lys Val
1 5

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

<400> 159

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

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

<400> 160

Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu
1 5

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

<400> 161

Arg Leu Leu Asp Glu Gln Phe Ala Val
1 5

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

<400> 162

Arg Leu Met Ser Ala Leu Thr Gln Val
1 5

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

<400> 163

Arg Leu Thr Glu Ser Val Leu Tyr Leu
1 5

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

<400> 164

Arg Met Leu Ile Lys Leu Leu Glu Val
1 5

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

<400> 165

Arg Val Ile Glu His Val Glu Gln Val
1 5

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

<400> 166

Ser Ile Leu Asp Ile Val Thr Lys Val
1 5

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

<400> 167

Ser Leu Ala Glu Ser Ser Phe Asp Val
1 5

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

<400> 168

Ser Leu Ala Val Leu Val Pro Ile Val
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 169

Ser Leu Phe Glu Trp Phe His Pro Leu
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 170

Ser Leu His Asn Gly Val Ile Gln Leu

1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 171

Ser Leu Ile Pro Ala Val Leu Thr Val
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 172

Ser Leu Leu Asn Phe Leu Gln His Leu
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 173

Ser Leu Thr Ser Glu Ile His Phe Leu
1 5

<210> 174
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 174

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

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

<400> 175

Thr Leu Phe Glu His Leu Pro His Ile
1 5

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

<400> 176

Thr Leu Gly Gln Ile Trp Asp Val
1 5

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

<400> 177

Val Leu Asp Glu Pro Tyr Glu Lys Val
1 5

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

<400> 178

Tyr Ile Phe Thr Thr Pro Lys Ser Val
1 5

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

<400> 179

Tyr Ile His Asn Ile Leu Tyr Glu Val
1 5

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

<400> 180

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

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 181

Tyr Leu Leu Glu Lys Phe Val Ala Val
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 182

Tyr Leu Leu His Phe Pro Met Ala Leu
1 5

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 183

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

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 184

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

<210> 185
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 185

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

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 186

Val Leu Leu Ala Gln Ile Ile Gln Val
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 187

Ser Tyr Pro Thr Phe Phe Pro Arg Phe
1 5

<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 188

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

<210> 189
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 189

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

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 190

Arg Tyr Asn Glu Lys Cys Phe Lys Leu
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 191

Lys Tyr Pro Asp Ile Ile Ser Arg Ile
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 192

Ser Tyr Ile Thr Lys Pro Glu Lys Trp
1 5

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

<400> 193

Ile Tyr Pro Gly Ala Phe Val Asp Leu
1 5

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

<400> 194

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
1 5

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

<400> 195

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

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

<400> 196

Ala Tyr Leu Lys Trp Ile Ser Gln Ile
1 5

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

<400> 197

Arg Trp Pro Lys Lys Ser Ala Glu Phe
1 5

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

<400> 198

Leu Tyr Trp Ser His Pro Arg Lys Phe
1 5

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

<400> 199

Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
1 5

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

<400> 200

Ala Tyr Leu Leu Gln Pro Ser Gln Phe
1 5

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

<400> 201

Ala Tyr Val Asn Thr Phe His Asn Ile
1 5

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

<400> 202

Ala Tyr Gly Thr Tyr Arg Ser Asn Phe
1 5

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

<400> 203

Tyr Tyr Gly Ile Leu Gln Glu Lys Ile
1 5

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 204

Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr Ala Tyr Phe
1 5

<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 205

Val Tyr Gly Leu Gln Arg Asn Leu Leu
1 5

<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 206

Lys Trp Pro Glu Thr Pro Leu Leu Leu
1 5

<210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 207

Ile Tyr Leu Glu Arg Phe Pro Ile Phe
1 5

<210> 208
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 208

Ser Tyr Asn Pro Ala Glu Asn Ala Val Leu Leu
1 5 10

<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 209

Val Phe His Pro Arg Gln Glu Leu Ile
1 5

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

<400> 210

Ala Tyr Pro Ala Ile Arg Tyr Leu Leu
1 5

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

<400> 211

Ile Tyr Ile Pro Ser Tyr Phe Asp Phe
1 5

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

<400> 212

Val Tyr Gly Asp Val Ile Ser Asn Ile
1 5

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

<400> 213

Tyr Tyr Asn Lys Val Ser Thr Val Phe
1 5

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

<400> 214

Ile Tyr Val Thr Ser Ile Glu Gln Ile
1 5

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

<400> 215

Ile Tyr Thr Gly Asn Ile Ser Ser Phe
1 5

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

<400> 216

Ile Tyr Ala Asp Val Gly Glu Glu Phe
1 5

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

<400> 217

Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu
1 5

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

<400> 218

Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile
1 5

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

<400> 219

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

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

<400> 220

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

<210> 221
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 221

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

<210> 222
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 222

Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 223

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

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 224

Ala Leu Ala Ser Val Ile Lys Glu Leu
1 5

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 225

Lys Met Asp Pro Val Ala Tyr Arg Val
1 5

<210> 226
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 226

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

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 227

Ala Leu Leu Lys Val Asn Gln Glu Leu
1 5

<210> 228
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 228

Tyr Leu Ile Thr Ser Val Glu Leu Leu
1 5

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

<400> 229

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

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

<400> 230

Val Leu Thr Glu Phe Thr Arg Glu Val
1 5

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

<400> 231

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

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

<400> 232

Lys Leu Ala Glu Ile Val Lys Gln Val
1 5

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

<400> 233

Ala Leu Leu Gly Lys Leu Asp Ala Ile

1 5

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 234

Tyr Leu Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Val
1 5

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

<400> 235

Lys Leu Phe Glu Glu Ile Arg Glu Ile
1 5

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

<400> 236

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

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

<400> 237

Ala Leu Arg Gly Glu Ile Glu Thr Val
1 5

<210> 238
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 238

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

<210> 239
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 239

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

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

<400> 240

Phe Leu Trp Glu Arg Pro Thr Leu Leu Val
1 5 10

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

<400> 241

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

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

<400> 242

Gly Leu Phe Ala Pro Val His Lys Val
1 5

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

<400> 243

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

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 244

Lys Ile Ala Glu Leu Leu Glu Asn Val
1 5

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

<400> 245

Lys Leu Gly Ala Val Phe Asn Gln Val
1 5

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

<400> 246

Lys Leu Ile Ser Ser Tyr Tyr Asn Val
1 5

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

<400> 247

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

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

<400> 248

Lys Leu Asn Asp Leu Ile Gln Arg Leu
1 5

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

<400> 249

Leu Leu Leu Gly Glu Arg Val Ala Leu
1 5

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

<400> 250

Asn Leu Ala Glu Val Val Glu Arg Val
1 5

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

<400> 251

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

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

<400> 252

Arg Thr Ile Glu Tyr Leu Glu Glu Val
1 5

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

<400> 253

Arg Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser Val
1 5

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

<400> 254

Arg Val Gln Glu Ala Ile Ala Glu Val
1 5

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

<400> 255

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

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

<400> 256

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

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

<400> 257

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

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

<400> 258

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

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

<400> 259

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

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

<400> 260

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

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

<400> 261

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

<210> 262
<211> 10
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 262

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

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

<400> 263

Val Leu Tyr Pro Ser Leu Lys Glu Ile
1 5

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

<400> 264

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

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

<400> 265

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

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

<400> 266

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

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

<400> 267

Ala Leu Asn Glu Asn Ile Asn Gln Val
1 5

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

<400> 268

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

<210> 269

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

<400> 269

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

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

<400> 270

Ser Val Leu Asp Gln Lys Ile Leu Leu
1 5

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

<400> 271

Leu Leu Leu Asp Lys Leu Ile Leu Leu
1 5

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

<400> 272

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

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 273

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

<210> 274
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 274

Ala Leu Ala Glu Ala Leu Lys Glu Val
1 5

<210> 275
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 275

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

<210> 276

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

<400> 276

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

<210> 277
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 277

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

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 278

Ala Leu Thr Ser Val Val Val Thr Leu
1 5

<210> 279
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 279

Ala Leu Trp Thr Gly Met His Thr Ile
1 5

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

<400> 280

Ala Thr Leu Asn Ile Ile His Ser Val
1 5

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

<400> 281

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

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

<400> 282

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

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

<400> 283

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

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

<400> 284

Lys Leu Asp Ala Phe Val Glu Gly Val
1 5

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

<400> 285

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

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

<400> 286

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala
1 5

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

<400> 287

Leu Ile Gly Glu Phe Leu Glu Lys Val
1 5

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

<400> 288

Leu Leu Asp Asp Ser Leu Val Ser Ile
1 5

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

<400> 289

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

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

<400> 290

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

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

<400> 291

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
1 5

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

<400> 292

Arg Ile Pro Ala Tyr Phe Val Thr Val
1 5

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

<400> 293

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

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

<400> 294

Arg Leu Ile Asp Leu His Thr Asn Val
1 5

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

<400> 295

Ser Leu Phe Ser Ser Pro Pro Glu Ile
1 5

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

<400> 296

Ser Leu Leu Ser Gly Arg Ile Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 297
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 297

Thr Leu Phe Tyr Ser Leu Arg Glu Val
1 5

<210> 298
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 298

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

<210> 299
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 299

Ala Leu Leu Arg Val Thr Pro Phe Ile
1 5

<210> 300
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 300

Thr Leu Ala Gln Gln Pro Thr Ala Val
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 301

Val Leu Ala Asp Phe Gly Ala Arg Val
1 5

<210> 302
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 302

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

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

<400> 303

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

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

<400> 304

Ser Leu Ile Asp Gln Phe Phe Gly Val
1 5

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

<400> 305

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
1 5

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

<400> 306

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

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

<400> 307

Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val
1 5

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

<400> 308

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
1 5

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

<400> 309

Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
1 5

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

<400> 310

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
1 5

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

<400> 311

Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val
1 5

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

<400> 312

Arg Leu Gly Ile Lys Pro Glu Ser Val
1 5

<210> 313
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 313

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

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

<400> 314

Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val
1 5

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

<400> 315

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

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

<400> 316

Leu Leu Arg Glu Lys Val Glu Phe Leu
1 5

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

<400> 317

Lys Leu Pro Glu Lys Trp Glu Ser Val
1 5

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

<400> 318

Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys Ile
1 5

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

<400> 319

Lys Leu Phe Asn Glu Phe Ile Gln Leu
1 5

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

<400> 320

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

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

<400> 321

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

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

<400> 322

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

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

<400> 323

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

<210> 324
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 324

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

<210> 325
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 325

Arg Leu Ser Glu Ala Ile Val Thr Val
1 5

<210> 326
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 326

Ala Leu Ser Asp Gly Val His Lys Ile
1 5

<210> 327
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 327

Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
1 5

<210> 328
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 328

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

<210> 329
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 329

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu
1 5

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

<400> 330

Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val
1 5

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

<400> 331

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

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

<400> 332

Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val
1 5

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

<400> 333

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

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

<400> 334

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

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

<400> 335

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

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

<400> 336

Tyr Leu Pro Thr Phe Phe Leu Thr Val
1 5

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

<400> 337

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

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

<400> 338

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

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

<400> 339

Arg Leu Ile Ser Lys Phe Asp Thr Val
1 5

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

<400> 340

Lys Val Phe Asp Glu Val Ile Glu Val
1 5

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

<400> 341

Tyr Leu Ala Ile Gly Ile His Glu Leu
1 5

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

<400> 342

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
1 5

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

<400> 343

Leu Leu Leu Pro Asp Tyr Tyr Leu Val
1 5

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

<400> 344

Val Tyr Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu
1 5

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

<400> 345

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
1 5

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

<400> 346

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

<210> 347
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 347

Ala Leu Asn Pro Ala Asp Ile Thr Val
1 5

<210> 348
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 348

Ala Tyr Lys Pro Gly Ala Leu Thr Phe
1 5

1

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 53, y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido tiene una longitud total de 10 a 30 aminoácidos, en que dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en el que dicho péptido, cuando está unido al MHC, se puede reconocer por linfocitos T CD8.

2. El péptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido tiene una longitud total de 10 a 16 aminoácidos, y más preferentemente en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 53.

3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos, y/o en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos del extremo N de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.

4. Un anticuerpo, soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, preferentemente el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que está unido a una molécula del MHC.

5. Un receptor de linfocito T (TCR), soluble o unido a membrana, que es reactivo con un ligando HLA, y dicho ligando tiene una identidad de al menos el 88% con, y preferentemente consiste en, la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID NO. 53, en el que opcionalmente dicho TCR se proporciona como una molécula soluble y también opcionalmente es portador de una función efectora adicional, como un dominio inmunoestimulador o una toxina.

6. Un ácido nucleico, que codifica un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.

7. Una célula hospedadora que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha célula hospedadora preferentemente es una célula presentadora de antígeno como una célula dendrítica, o un linfocito T o un linfocito NK.

8. Un procedimiento para producir el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, o el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7 que presenta el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o que expresa el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, y el aislamiento de dicho péptido, dicho anticuerpo o dicho TCR a partir de la célula hospedadora y/o de su medio de cultivo.

9. Un procedimiento *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el procedimiento poner 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 una construcción 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 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

10. Un linfocito T activado, producido con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la reivindicación 1 o 2.

11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo consistente en el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

12. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en medicina.

13. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer.

14. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el TCR de acuerdo con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en que dicho cáncer se seleccionado entre el grupo consistente en carcinoma hepatocelular, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de colon o recto o leucemia y otros tumores que muestren una expresión en exceso de CFHR5.

15. Un kit que comprende:

(a) un envase que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en forma de solución o de liofilizado;
(b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada;
(c) opcionalmente, al menos un péptido más, seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 52, y las SEQ ID NO. 54 a SEQ ID NO. 346, y
(d) opcionalmente, instrucciones para (I) el uso de la solución o (II) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada, y, opcionalmente,
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.

Figura 1A

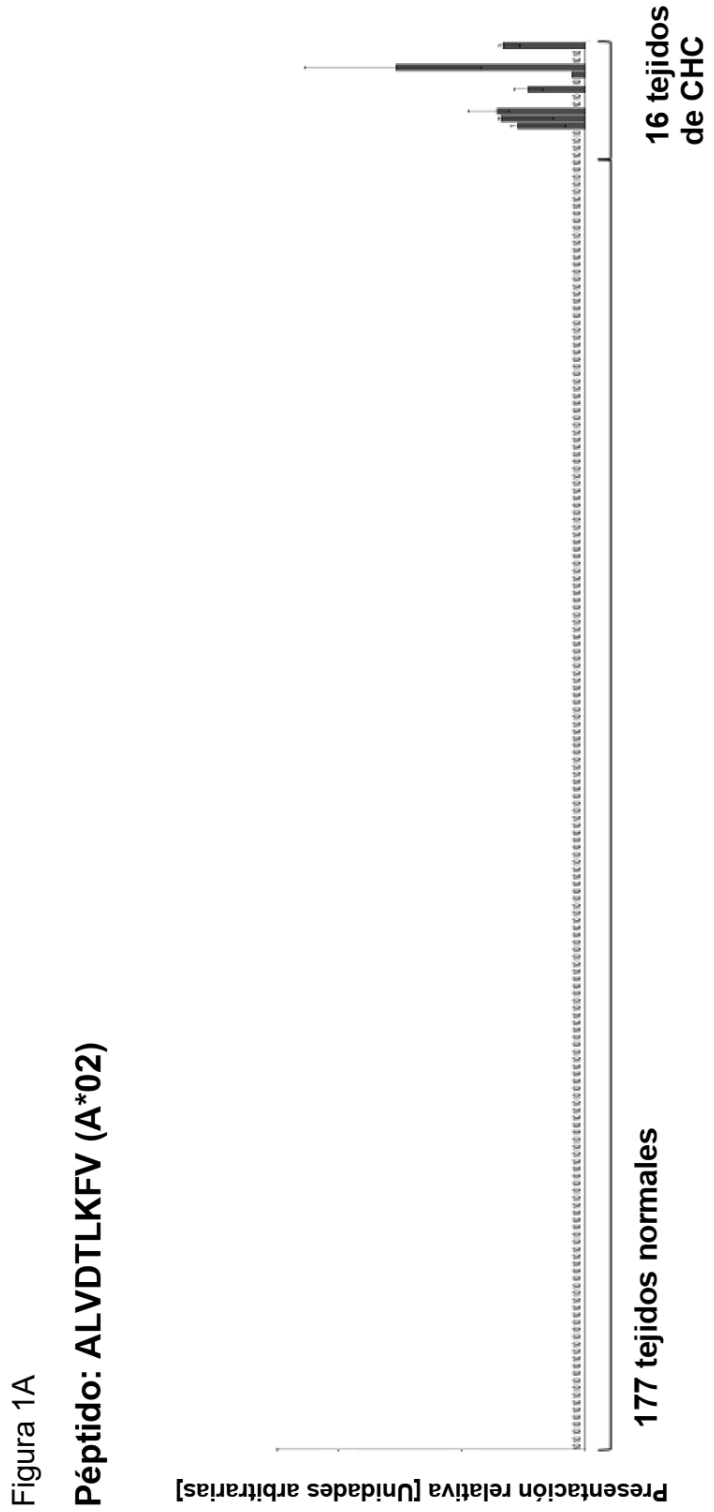

Péptido: ALVDTLKFV (A*02)
Presentación relativa [Unidades arbitrarias]
177 tejidos normales
16 tejidos de CHC

Figura 1B

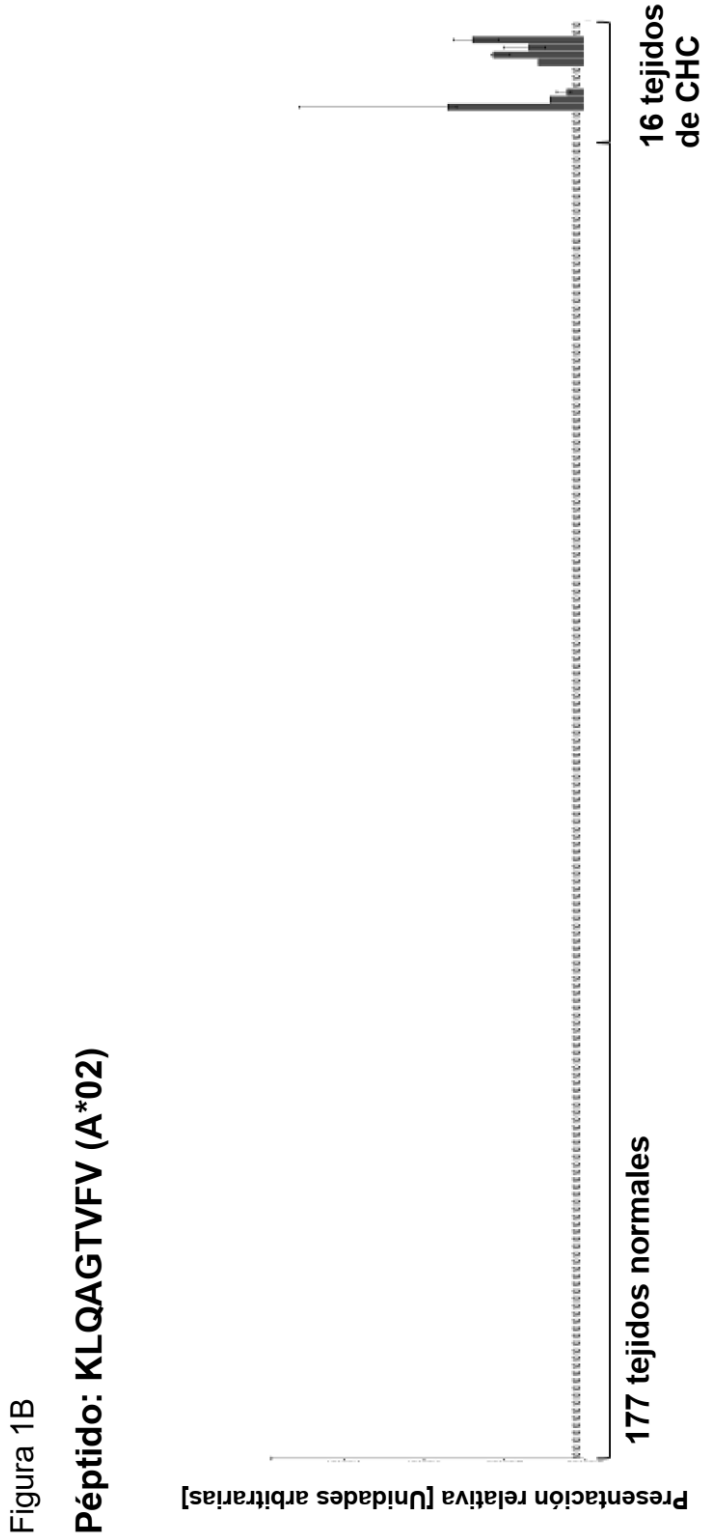

Péptido: KLQAGTVFV (A*02)
Presentación relativa [Unidades arbitrarias]
177 tejidos normales
16 tejidos de CHC

Figura 1C

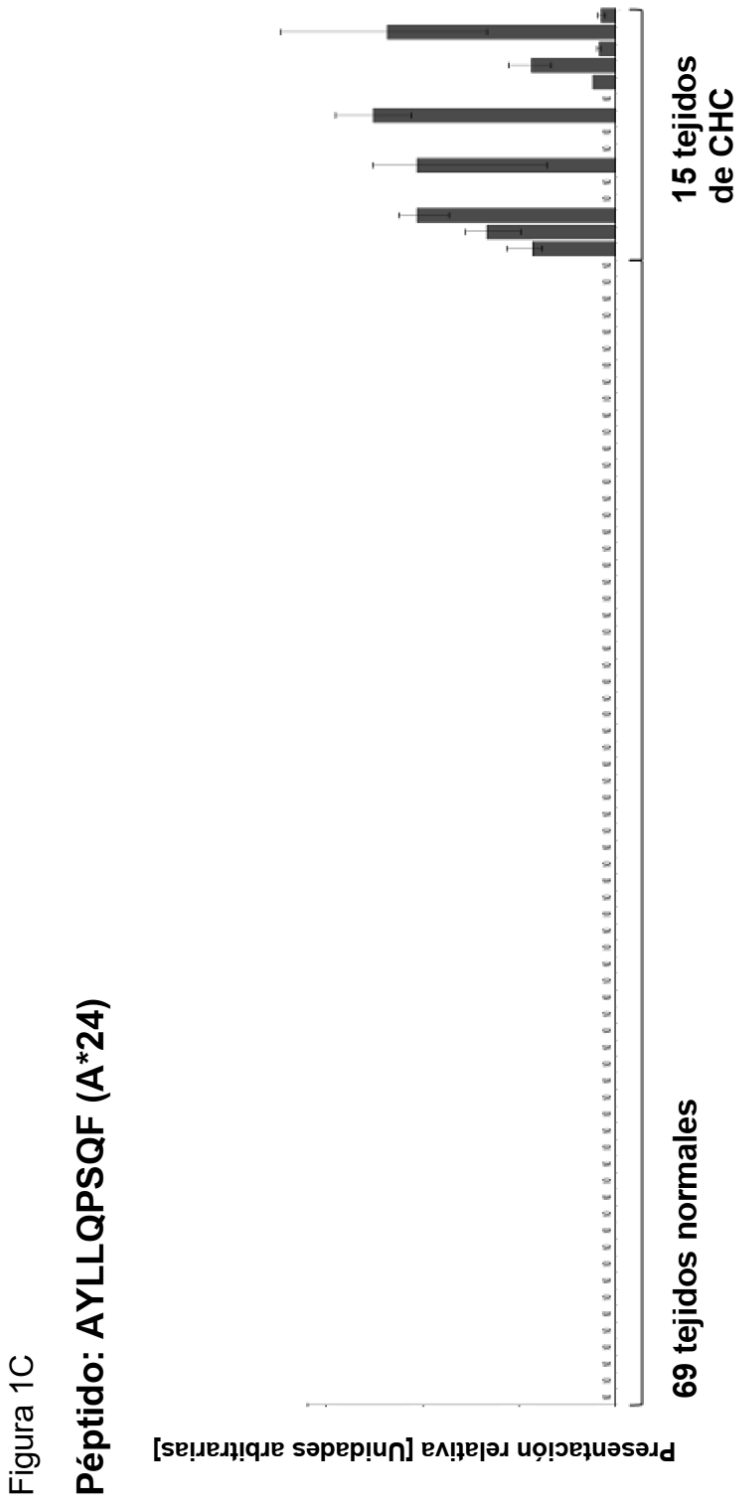

Péptido: AYLLQPSQF (A*24)
Presentación relativa [Unidades arbitrarias]
69 tejidos normales
15 tejidos de CHC

Figura 1D

Péptido: KIDEKNFVV (A*02)
Seq ID: 63

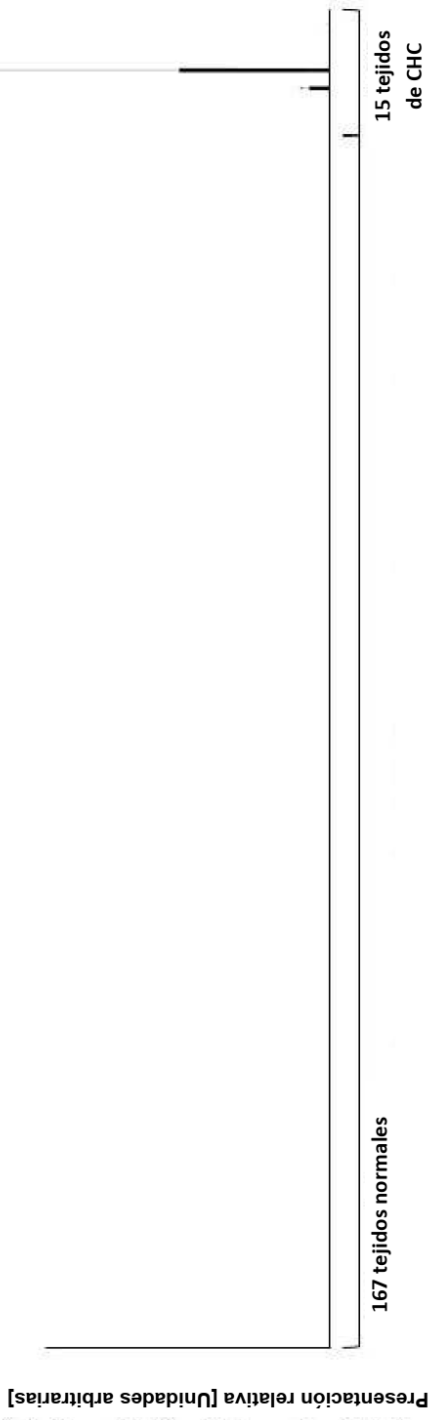


Figura 1E

Péptido: KIDEKNFVV (A*02)
SEQ ID: 63

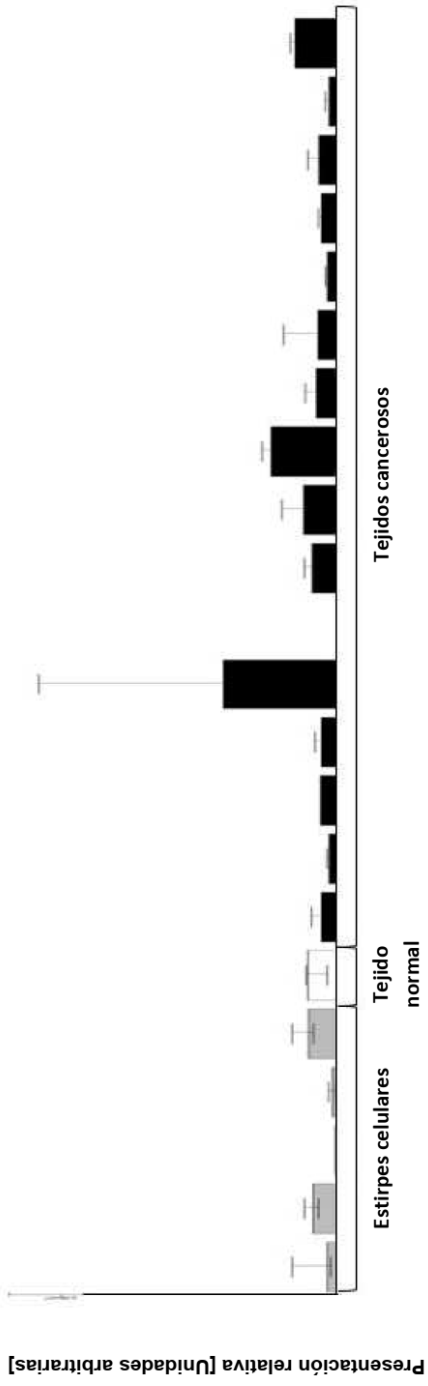


Figura 1F

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

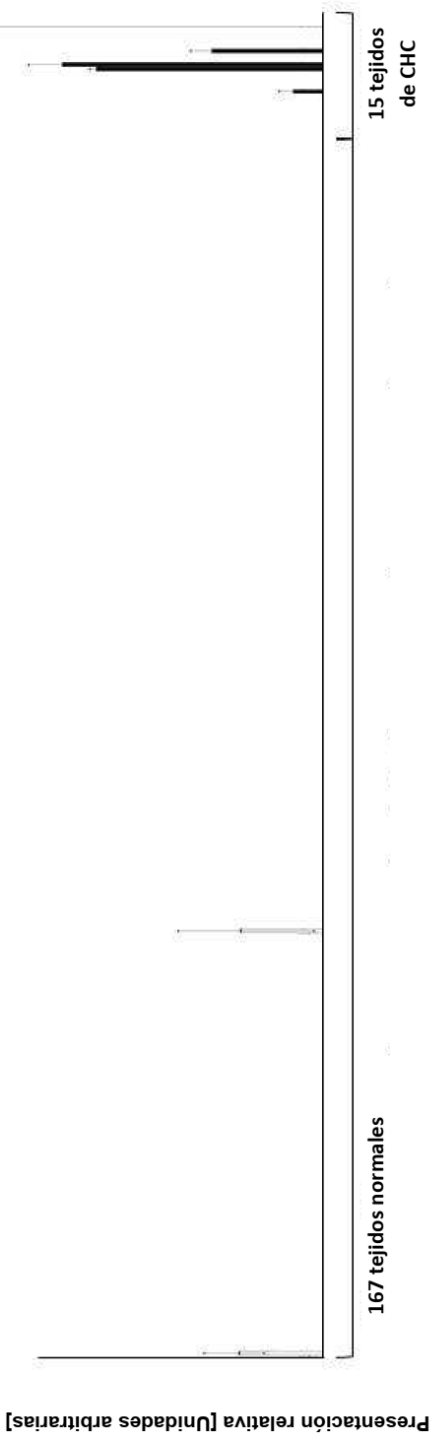


Figura 1G

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

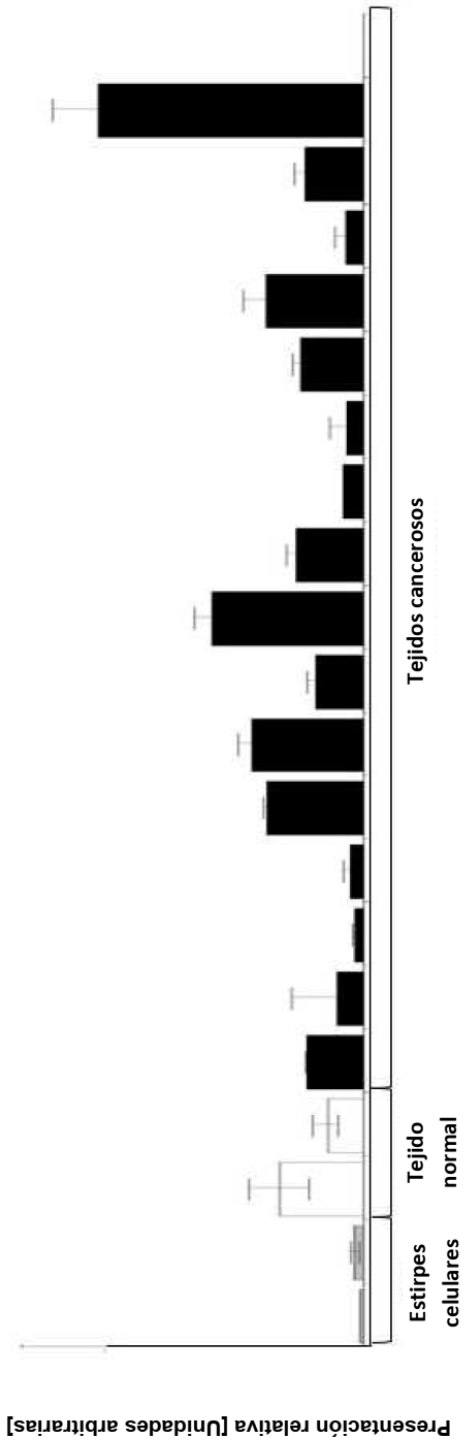


Figura 1H

Péptido: SVWFGPKEV (A*02)
Seq ID: 104

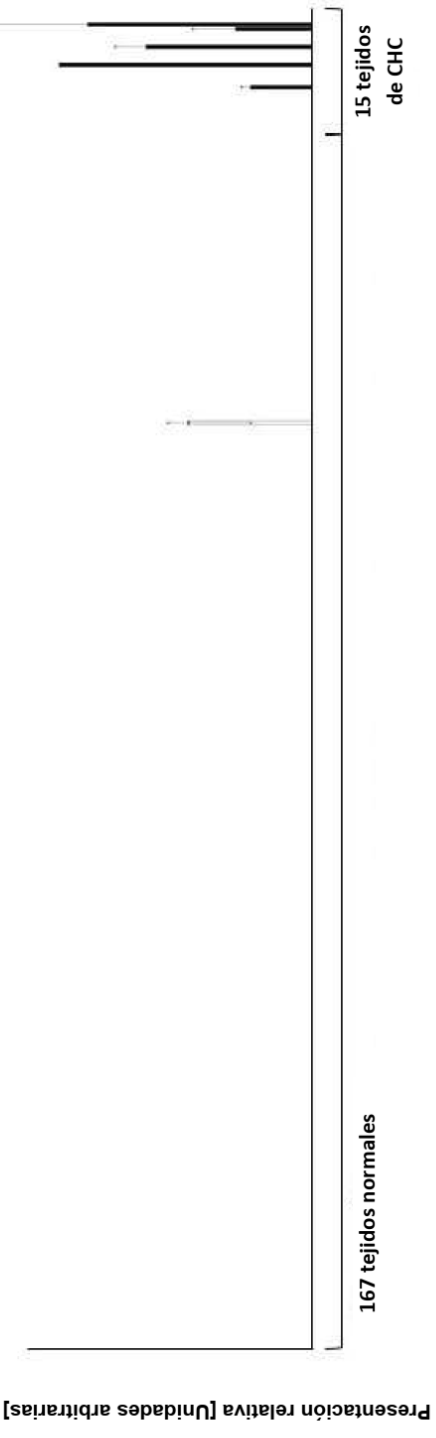


Figura 1l

Péptido: SVWFGPKEV (A*02)
SEQ ID: 104

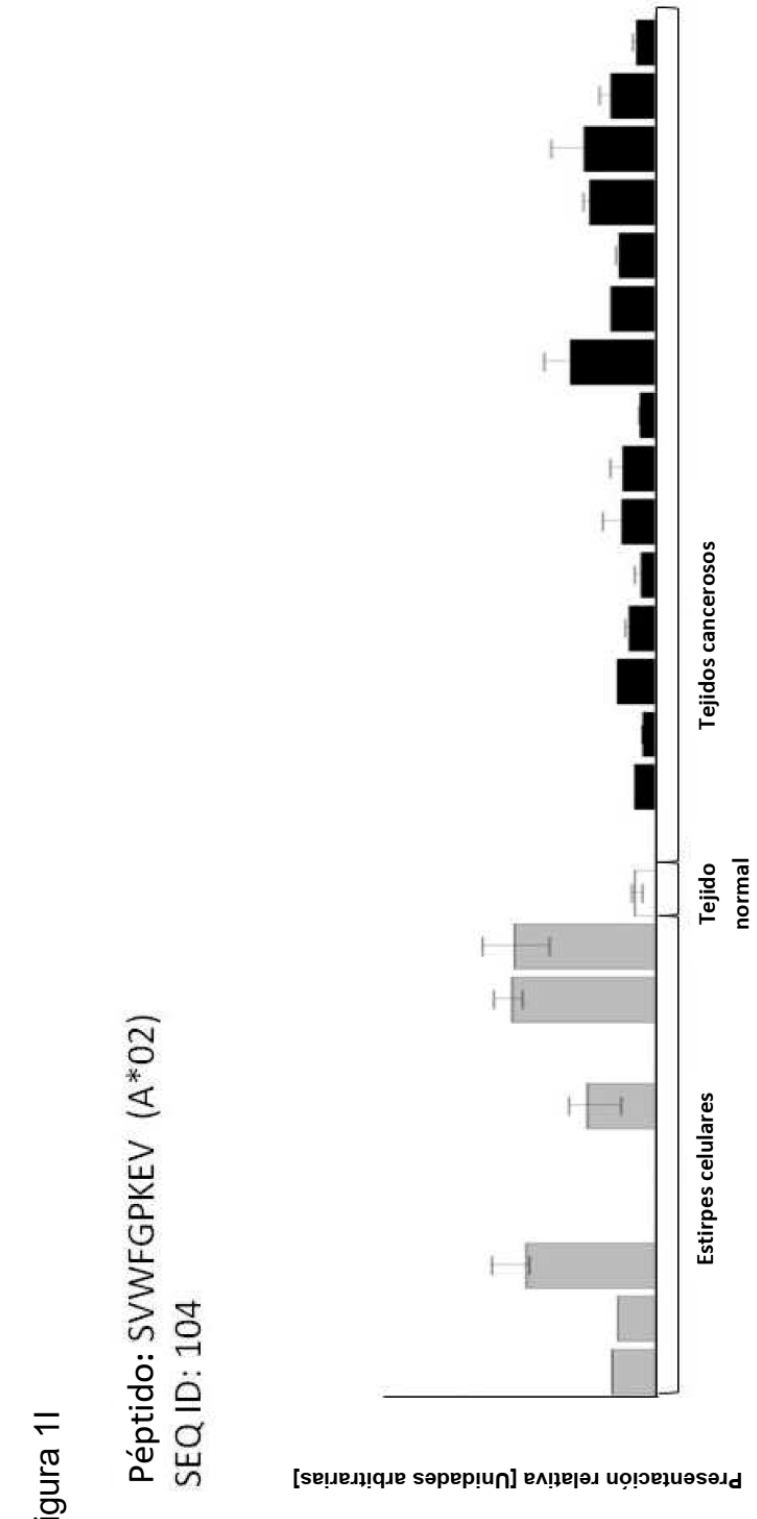


Figura 1J

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

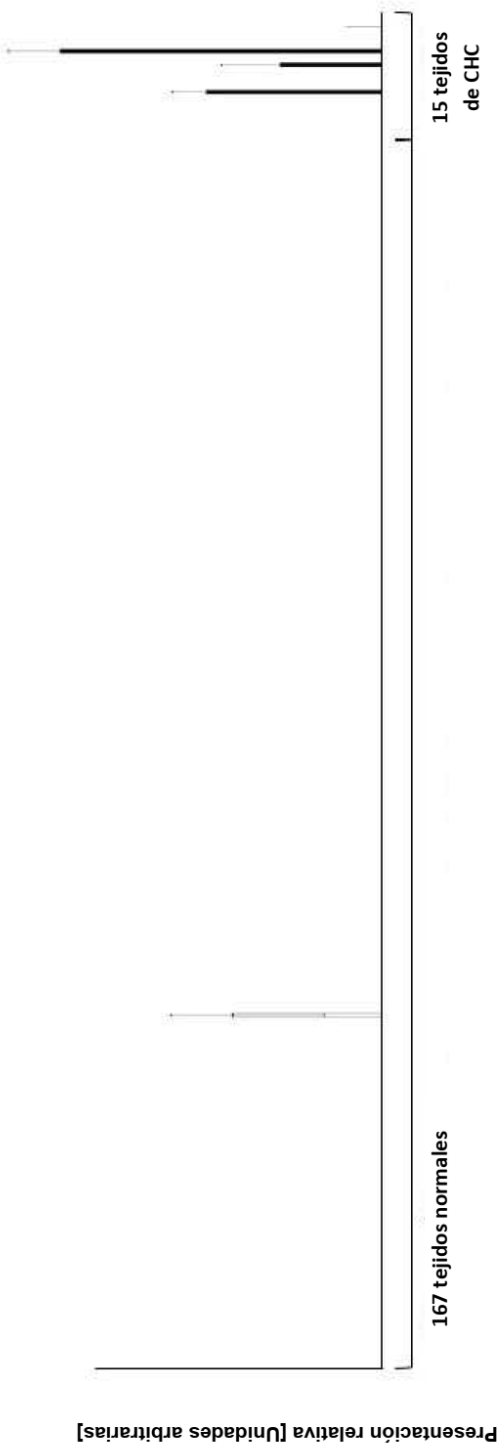


Figura 1K

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

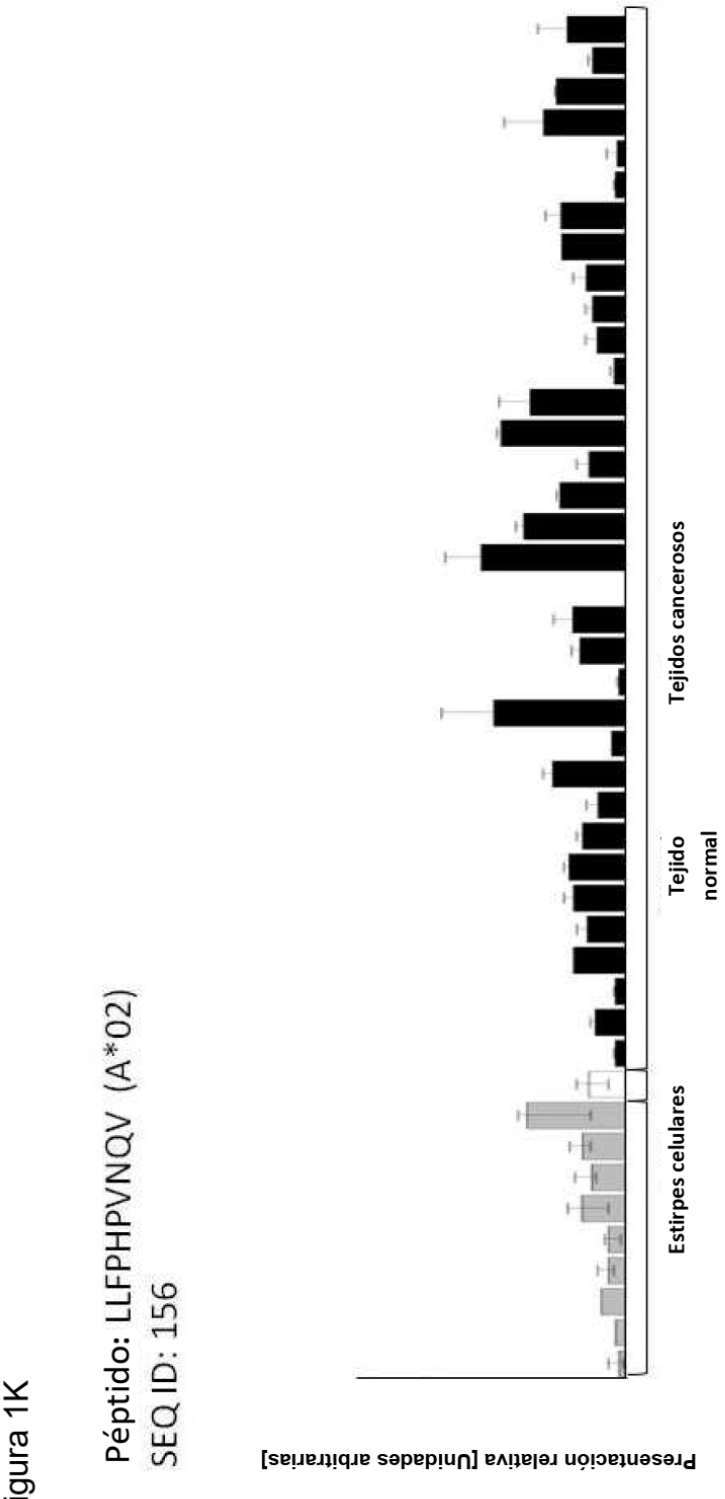


Figura 1L

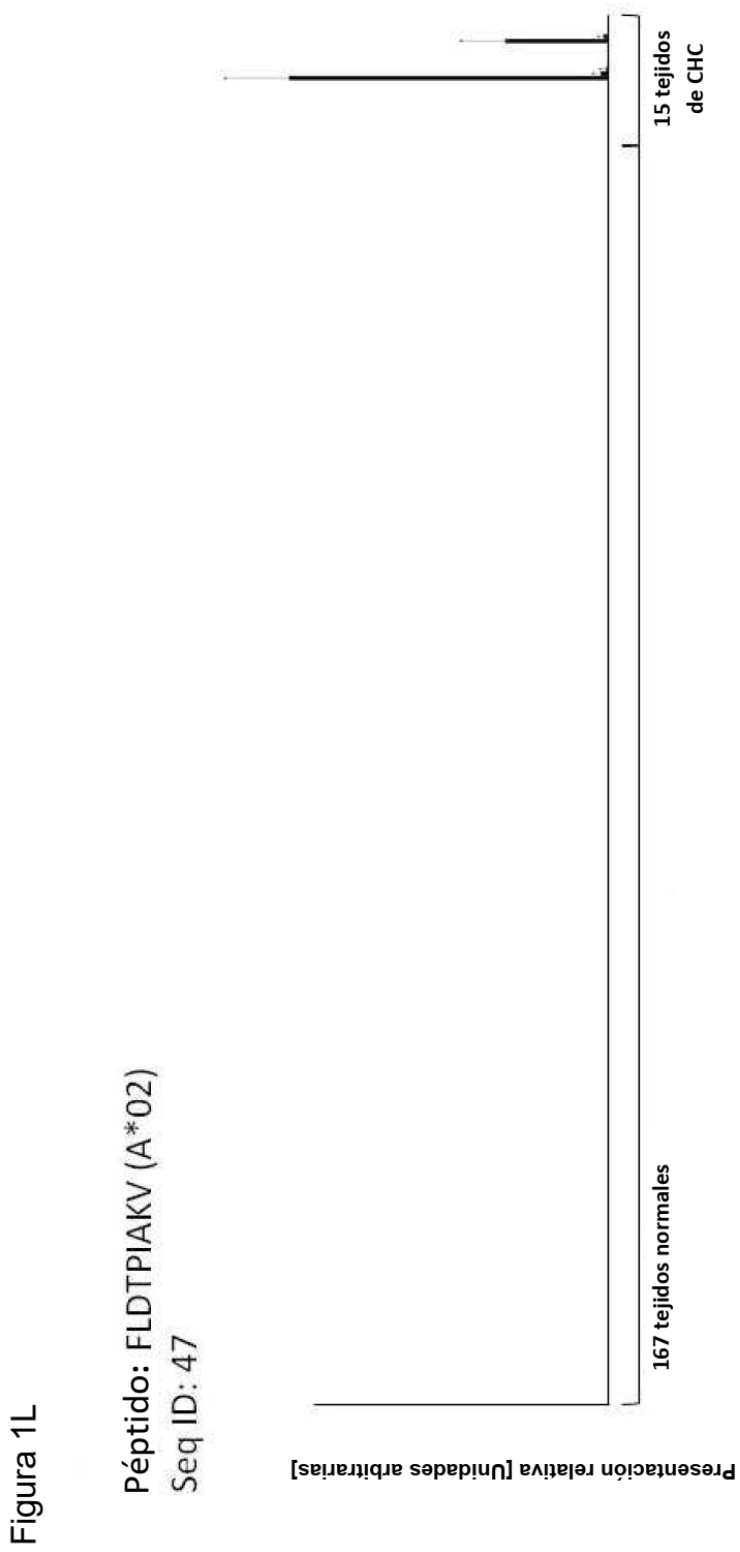
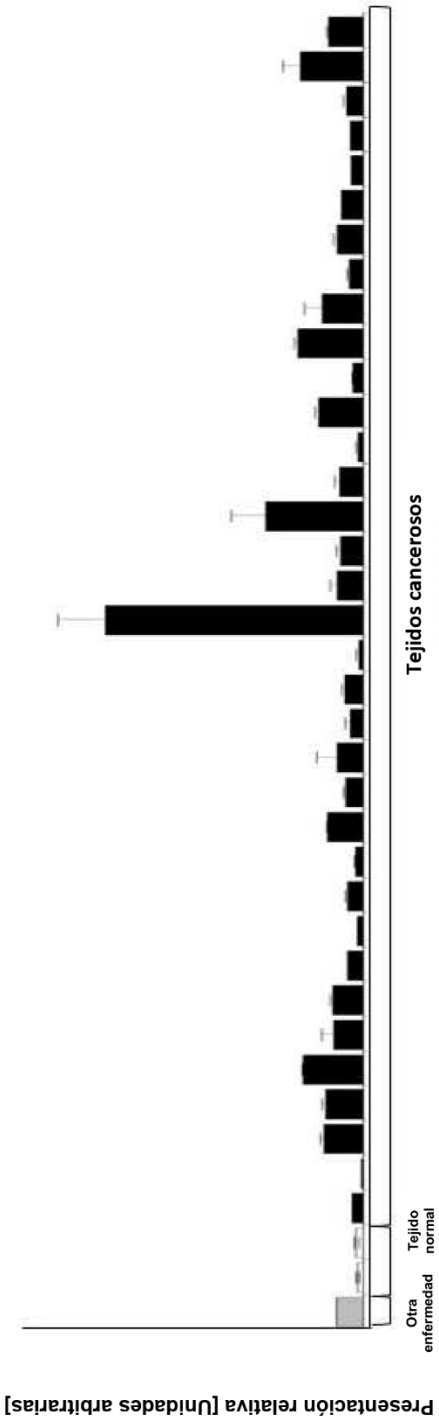

Péptido: FLDTPIAKV (A*02)
Seq ID: 47
Presentación relativa [Unidades arbitrarias]
167 tejidos normales
15 tejidos de CHC

Figura 1M

Péptido: FLDTPIAKV (A*02)
SEQ ID: 47



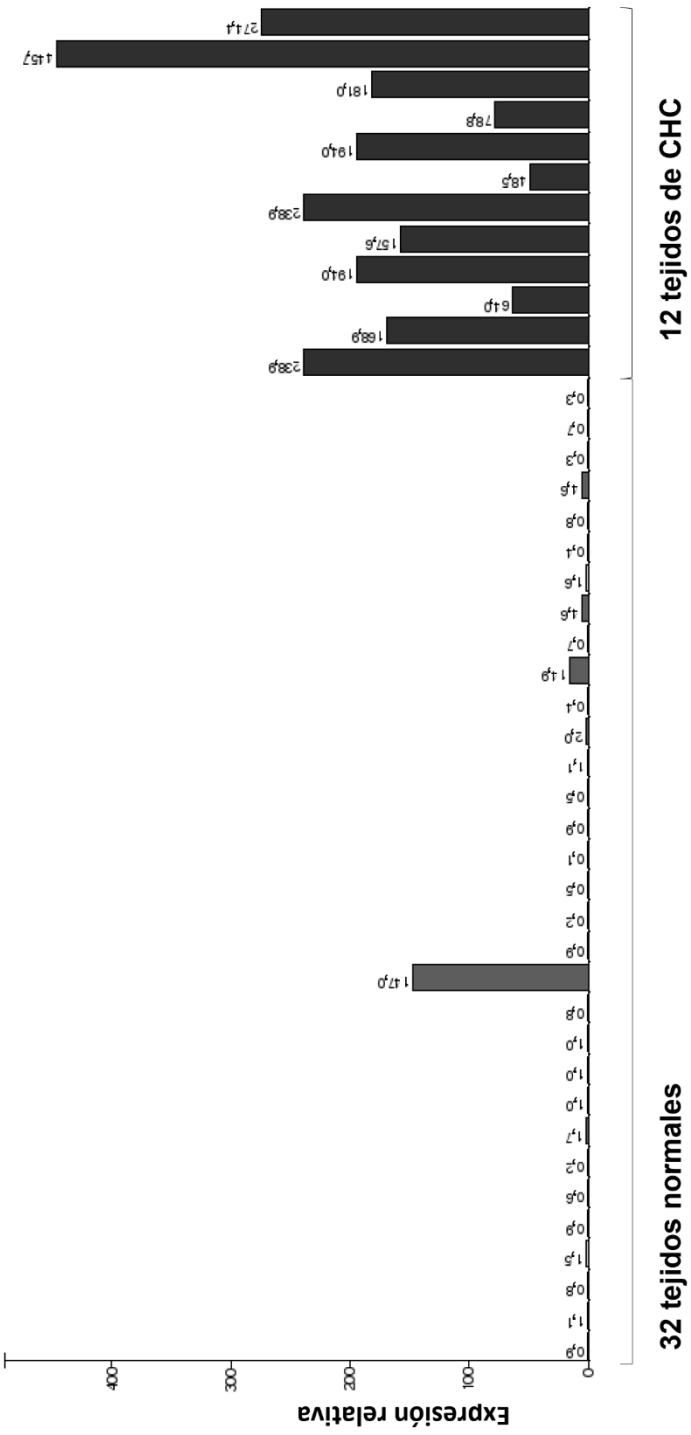

Expresión relativa
0
100
200
300
400
32 tejidos normales
12 tejidos de CHC

Figura 2A

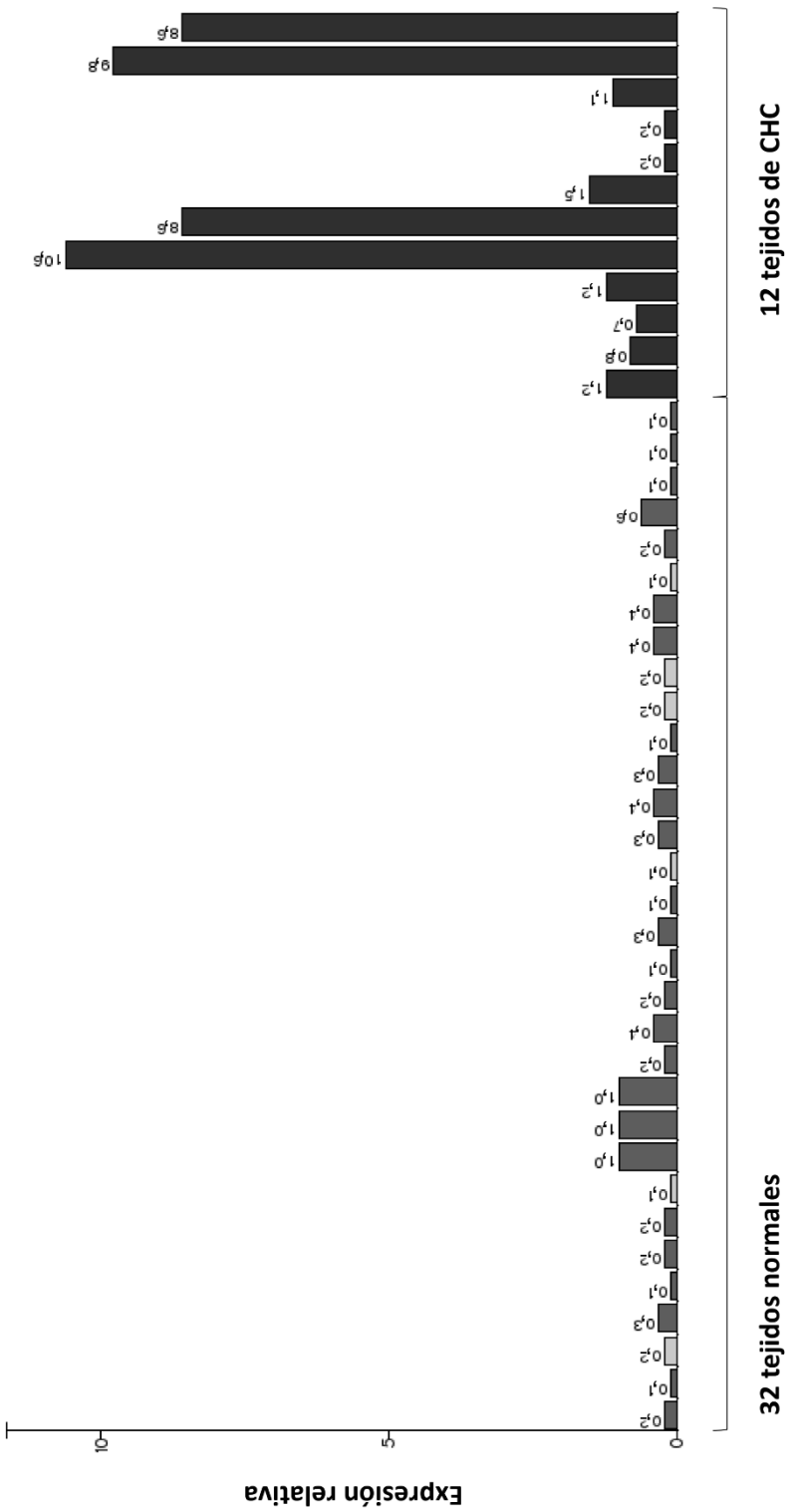

Expresión relativa
0
5
10
32 tejidos normales
12 tejidos de CHC

Figura 2B

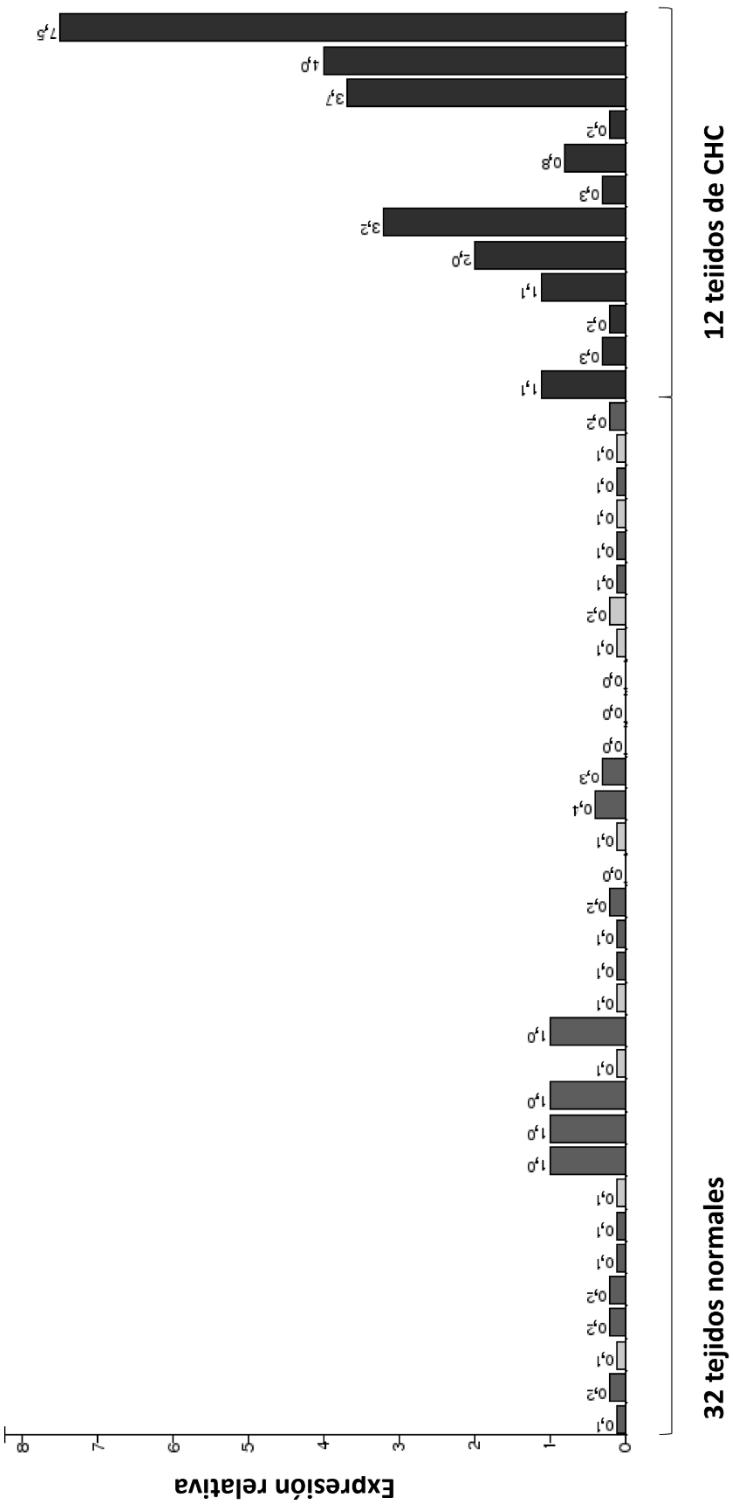

Expresión relativa
0
1
2
3
4
5
6
7
8
32 tejidos normales
12 teiidos de CHC

Figura 2C

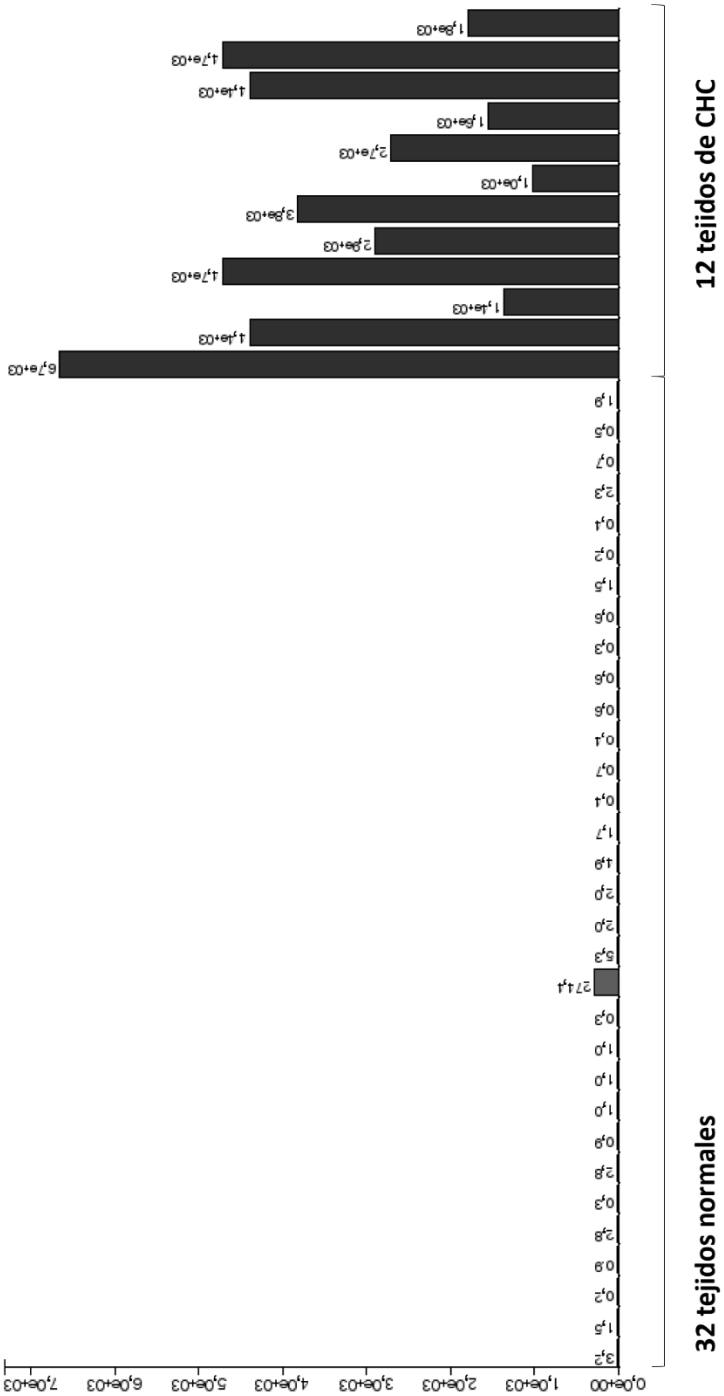

Expresión relativa
0,0e+00
1,0e+03
2,0e+03
3,0e+03
4,0e+03
5,0e+03
6,0e+03
7,0e+03
32 tejidos normales
12 teijidos de CHC

Figura 2D

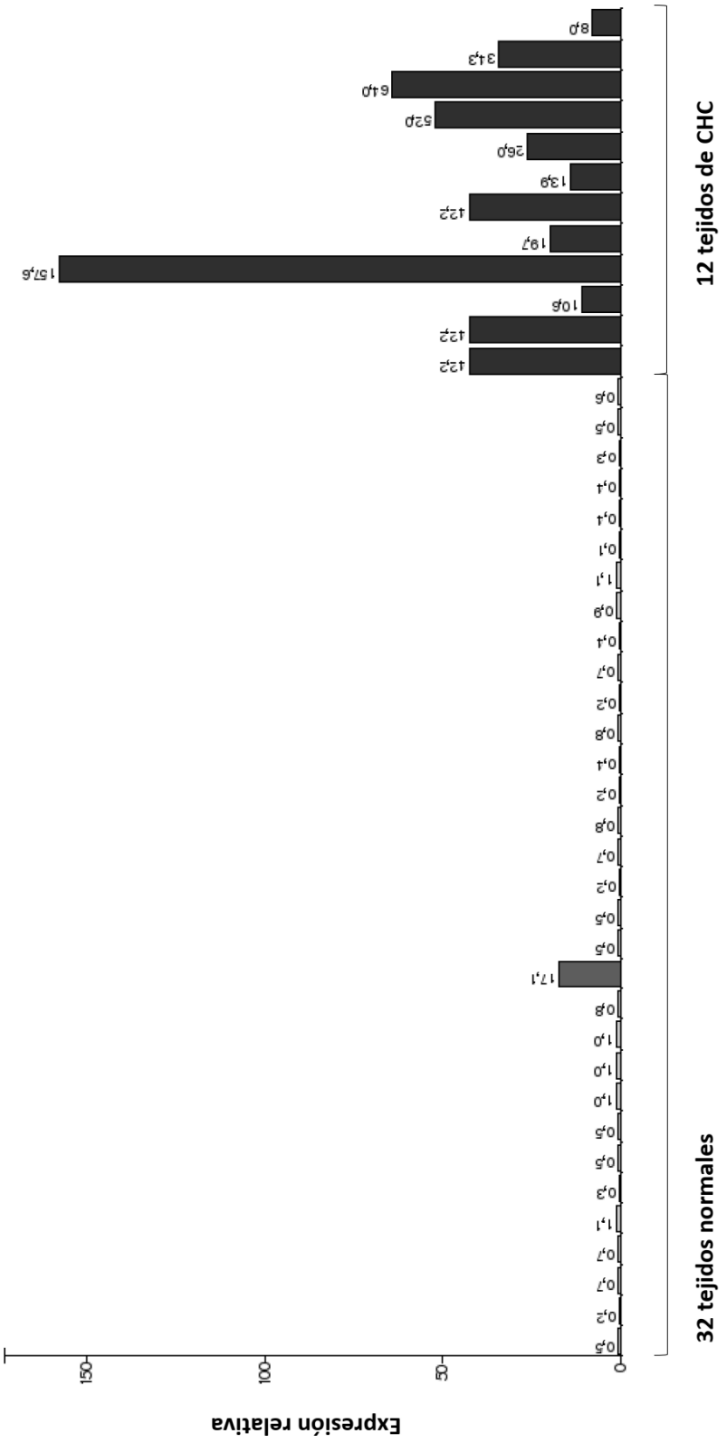

Expresión relativa
0
50
100
150
0,5
0,2
0,7
0,7
1,1
0,3
0,5
0,5
1,0
1,0
1,0
0,8
17,1
0,5
0,5
0,2
0,7
0,8
0,2
0,4
0,8
0,2
0,7
0,4
0,9
1,1
0,1
0,4
0,3
0,5
0,5
12,2
12,2
10,6
157,6
19,7
42,2
13,9
26,0
52,0
64,0
34,3
8,0
32 tejidos normales
12 tejidos de CHC

Figura 2E

Figura 2F

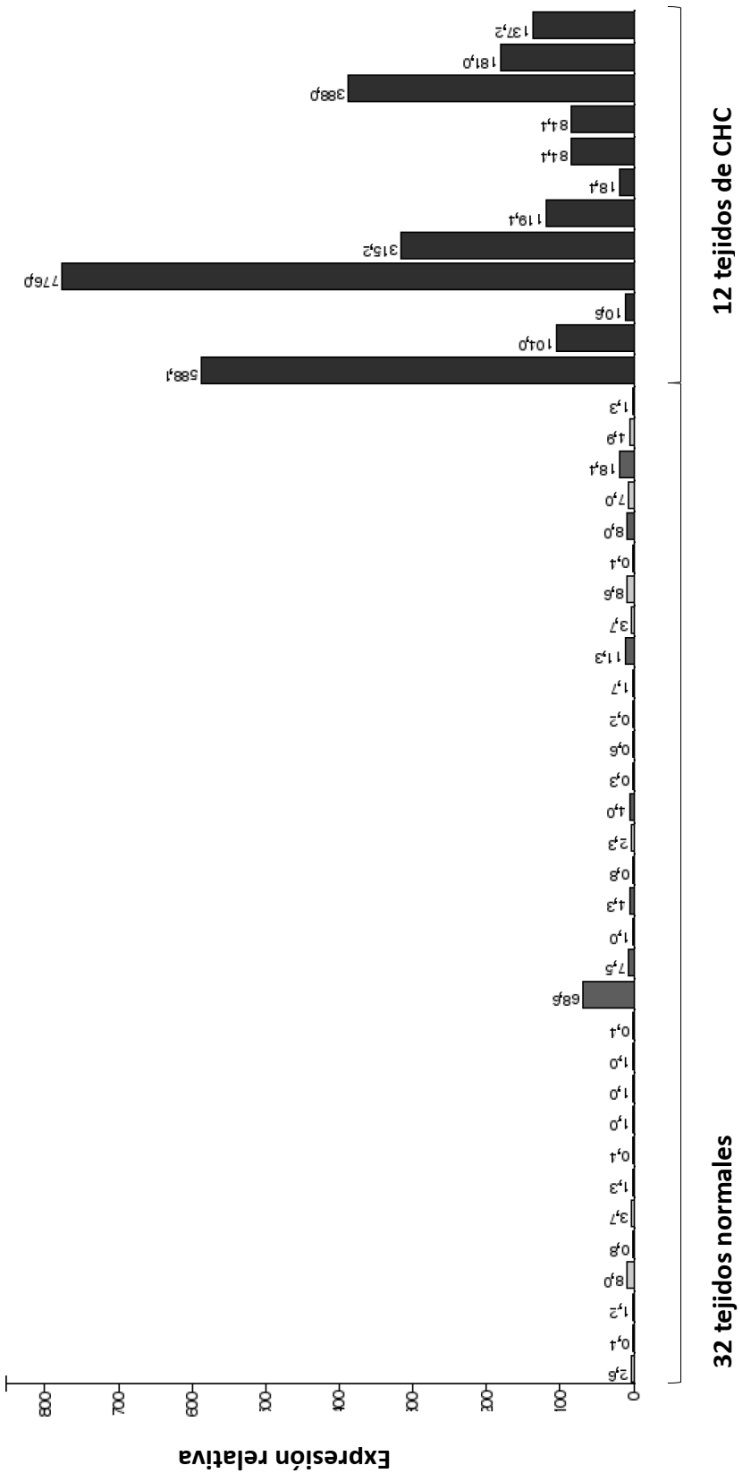

Expresión relativa
0
100
200
300
400
500
600
700
800
32 tejidos normales
12 tejidos de CHC

Figura 3

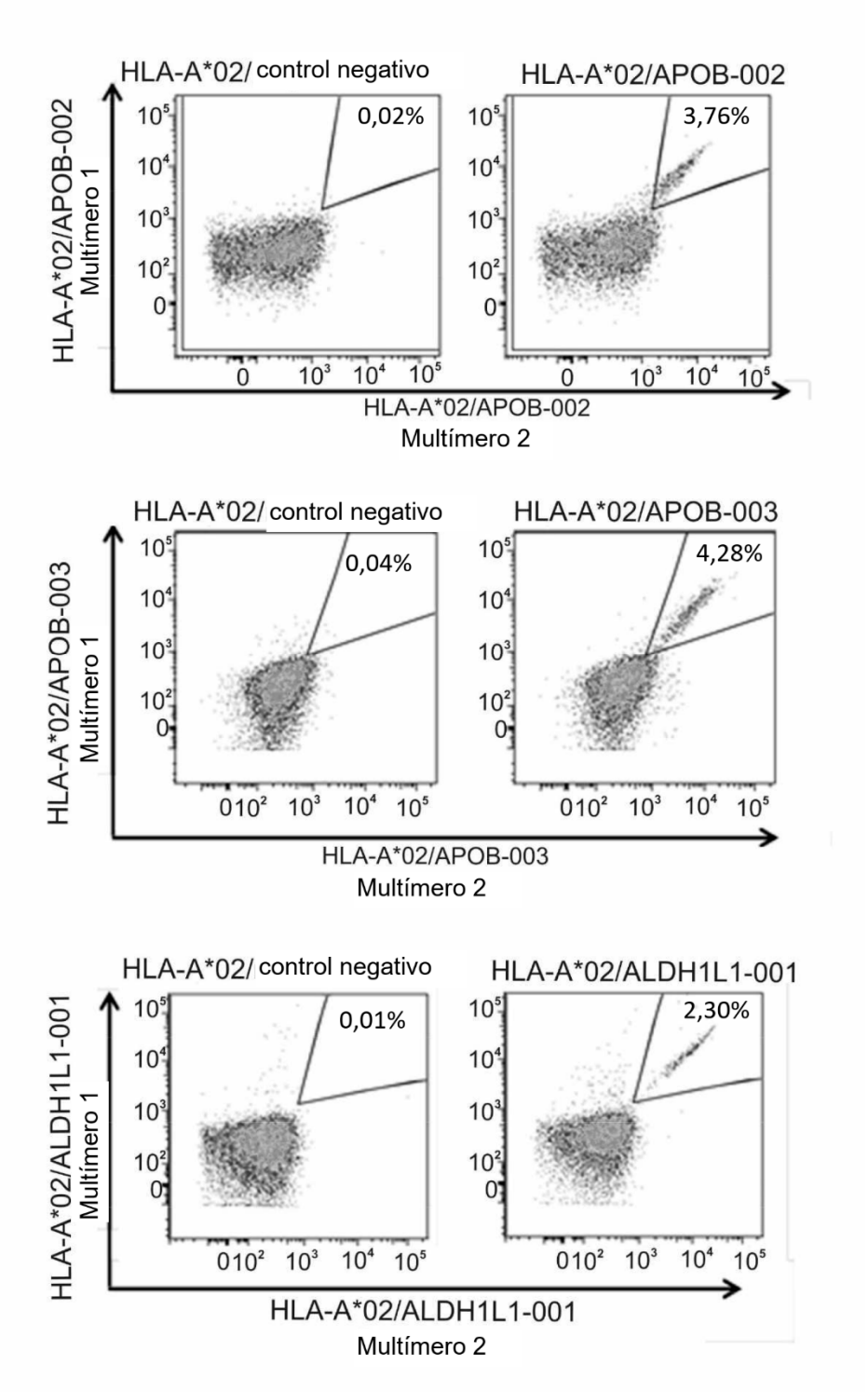
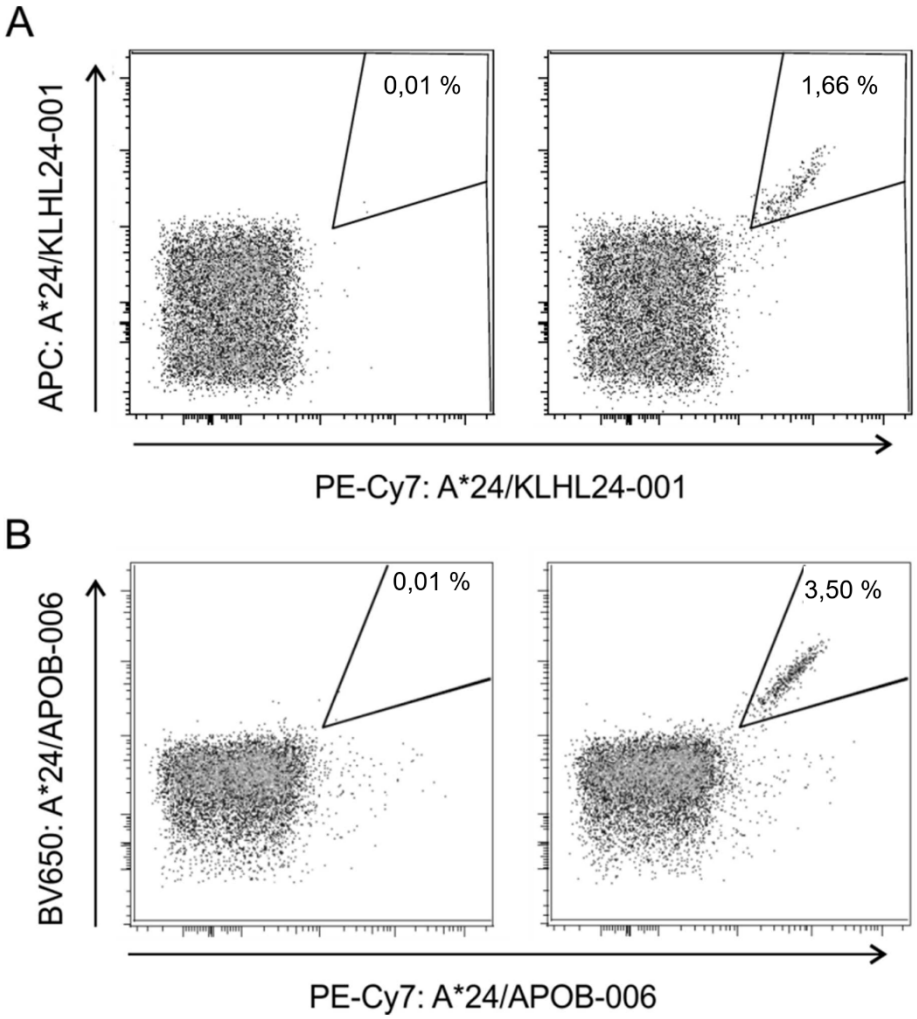

HLA-A*02/ control negativo
0,02%
HLA-A*02/APOB-002
3,76%
HLA-A*02/APOB-002 Multímero 1
HLA-A*02/APOB-002 Multímero 2
HLA-A*02/ control negativo
0,04%
HLA-A*02/APOB-003
4,28%
HLA-A*02/APOB-003 Multímero 1
HLA-A*02/APOB-003 Multímero 2
HLA-A*02/ control negativo
0,01%
HLA-A*02/ALDH1L1-001
2,30%
HLA-A*02/ALDH1L1-001 Multímero 1
HLA-A*02/ALDH1L1-001 Multímero 2

Figura 4


A
0,01 %
1,66 %
APC: A*24/KLHL24-001
PE-Cy7: A*24/KLHL24-001
B
0,01 %
3,50 %
BV650: A*24/APOB-006
PE-Cy7: A*24/APOB-006