

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 964**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574	(2006.01) C07K 14/74	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01) C07K 7/06	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01) A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	
A61P 43/00	(2006.01)	
C07K 14/47	(2006.01)	
C07K 14/725	(2006.01)	
C12N 5/0783	(2010.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2017** **PCT/EP2017/054908**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017** **WO17153247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2017** **E 17709931 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 3426281**

54 Título: **Tratamientos de cáncer de útero**

30 Prioridad:

08.03.2016 GB 201603987
08.03.2016 US 201662305222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.03.2025

73 Titular/es:

IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.00%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:

MAHR, ANDREA;
WEINSCHENK, TONI;
SONG, COLETTE;
SCHOOR, OLIVER;
FRITSCH, JENS y
SINGH, HARPREET

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 005 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamientos de cáncer de útero

5 La presente invención se refiere en general al campo de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y células para su uso en métodos inmunoterapéuticos. Por lo tanto, la presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia del cáncer. La presente invención adicionalmente se refiere generalmente a epítomos peptídicos de linfocitos T asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que pueden servir, por ejemplo, como
10 principios farmacéuticos activos de composiciones de vacunas que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales, o para estimular linfocitos T *ex vivo* y transferir a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o péptidos como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, receptores de linfocitos T solubles y otras moléculas de unión.

En el presente documento se desvelan varias secuencias peptídicas y sus variantes derivadas de moléculas HLA de
15 clase I de células tumorales humanas que pueden usarse en composiciones de vacunas para provocar respuestas inmunitarias antitumorales, o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéuticamente/inmunológicamente activos.

Antecedentes de la invención

20 *Cáncer uterino*: El cáncer del cuerpo uterino (cáncer de endometrio) es el sexto cáncer más frecuente en las mujeres. A nivel mundial, se diagnostica con una tasa de incidencia de 8,2 por 100.000, que representan el 4,8 % de todos los casos de cáncer en mujeres. En 2012, se diagnosticó cáncer de endometrio a 320.000 mujeres. La tasa de mortalidad de 1,8 por 100.000 mujeres es sustancialmente inferior a la tasa de incidencia. Con respecto al cáncer de cuello
25 uterino, que es el cuarto cáncer más frecuente en las mujeres, en 2012 se diagnosticaron 528.000 casos, lo que corresponde a una tasa de incidencia de 14 por cada 100.000 mujeres o el 7,9 % de todos los cánceres diagnosticados en mujeres. De nuevo, con 6,8 por 100.000, la tasa de mortalidad por cáncer de cuello uterino es claramente inferior a la tasa de incidencia (Informe Mundial sobre el Cáncer, 2014).

30 Las tasas de incidencia del cáncer de endometrio varían mucho entre países; cerca de dos tercios de los nuevos casos estimados se producen en países con niveles de desarrollo humano muy altos o altos. En consecuencia, las tasas de incidencia son elevadas en Europa septentrional y oriental y en América del Norte (tasa estandarizada por edad [ASR] = 14 y 19 por 100.000, respectivamente), y tienden a ser bajas en África septentrional y Asia occidental (ASR = 5 por 100.000) (World Cancer Report, 2014).

35 El cáncer de cuello uterino afecta sobre todo a las mujeres de los países con menos recursos; casi el 70 % de la carga mundial se da en zonas con niveles bajos o medios de desarrollo humano, y más de una quinta parte de todos los nuevos casos de cáncer de cuello de útero se diagnostican en la India. Esta enfermedad es el cáncer más frecuente entre las mujeres de 39 de los 184 países del mundo, y es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de
40 45 países. Estos países se encuentran principalmente en el África subsahariana (ASR = 35 por 100.000), partes de Asia y algunos países de América Central y del Sur (ASR = 21 por 100.000). Las tasas de incidencia más bajas suelen darse en Europa occidental (ASR = 11 por 100.000), Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda, y el Mediterráneo oriental (World Cancer Report, 2014).

45 La tasa de supervivencia a 1 año del cáncer de endometrio es de aproximadamente el 92 %, mientras que es de aproximadamente el 87 % para el cáncer de cuello uterino (SEER Stat facts, 2014). La tasa de supervivencia a 5 años del cáncer de endometrio es del 82 % y del 68 % en el caso del cáncer de cuello uterino. Como para muchos cánceres, el cáncer de endometrio es una enfermedad relacionada con la edad. La probabilidad de morir de cáncer de endometrio es <0,1 % antes de los 50 años, el 0,2 % entre 50 y 70 años y el 0,5 % para las mujeres de más de 70 años. En
50 cambio, el riesgo de morir de cáncer de cuello uterino a lo largo de la vida es bimodal, alcanzando su punto máximo en el grupo de mujeres menores de 50 años, así como por encima de 70 años (American Cancer Society, 2015).

Más del 80 % de los cánceres de endometrio se producen como adenocarcinomas endometrioides (tipo I), una forma que se asocia a la exposición a los estrógenos y que está entre bien y moderadamente diferenciada. La obesidad es
55 uno de los factores de riesgo del cáncer endometriode, estimándose que representan hasta el 40 % de los casos en todo el mundo (World Cancer Report, 2014). Otros factores de riesgo son la hipertensión arterial y la diabetes mellitus (National Cancer Institute, 2015). Los anticonceptivos orales que contienen progestágenos disminuyen el riesgo. Las principales lesiones genéticas incluyen inestabilidad de microsatélites y mutaciones de los genes PTEN, PIK3CA, ARID1A, KRAS y CTNNB1 (β -catenina) (World Cancer Report, 2014).

60 Además de los adenocarcinomas endometrioides, existen carcinomas endometriales de alto grado no relacionados con los estrógenos (adenocarcinomas serosos y de células claras no endometrioides, tipo II) que se asocian a un mal pronóstico. Los carcinomas no endometrioides están asociados a mutaciones TP53 y PPP2R1A, pérdida de cadherina-E, amplificación de HER2/neu y pérdida de heterocigosidad en múltiples locus (World Cancer Report, 2014).

65 El cáncer de cuello uterino presenta dos tipos histológicos principales: carcinoma de células escamosas (85-90 %) y

adenocarcinoma (10-15 %), que están igualmente asociados con la infección por el virus del papiloma humano (VPH), un importante factor de riesgo de cáncer de cuello de útero. El VPH provoca lesiones precancerosas que pueden detectarse y tratarse. La edad media de aparición de las lesiones de bajo grado es de 24-27 años y de 35-42 años para las lesiones de alto grado. Al menos el 20 % de las lesiones de alto grado evolucionan a carcinoma invasivo en 10 años. La vacunación contra el VPH ofrece una opción preventiva. Las mutaciones somáticas más comunes en el cáncer de cuello uterino se encontraron para PIK3CA, y se asocian con una menor supervivencia (World Cancer Report, 2014).

El tratamiento de los carcinomas de endometrio depende del estadio. La mayoría de los carcinomas endometriales comprenden adenocarcinomas endometrioides bien diferenciados a moderadamente diferenciados que suelen estar confinados al cuerpo uterino en el momento del diagnóstico y pueden curarse mediante histerectomía (World Cancer Report, 2014). Alternativamente, para mantener la fertilidad en pacientes con carcinomas endometriales en estadio inicial y deseo de tener hijos, una terapia conservadora con Megesterolacetat puede ser una opción. Sin embargo hay que tener en cuenta la elevada tasa de recaídas. Para pacientes con carcinomas endometriales progresados, una histerectomía que preceda a otros abordajes paliativos puede mejorar la calidad de vida, así como el pronóstico. Con frecuencia se combina con radioterapia adyuvante. Los pacientes inoperables reciben radioterapia primaria. Si no es posible ni la escisión ni la radiación, los carcinomas con receptores de progesterona positivos se tratan con gestágeno o tamoxifeno. En caso de progresión tras la terapia endocrina o carcinomas con receptores de progesterona negativos, los pacientes reciben Adriamicina, Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel o Docetaxel (Leitlinie Endometriumkarzinom, 2008). Adicionalmente, el acetato de megestrol se ha aprobado por la FDA para el tratamiento paliativo del cáncer de endometrio avanzado (National Cancer Institute, 2015). Los pacientes portadores de una mutación de PTEN se tratan con inhibidores de PARP (Dedes et al., 2010).

También las terapias para el cáncer de cuello uterino dependen del estadio. En las primeras fases, la escisión es el tratamiento convencional, que puede combinarse con radioterapia (quimioterapia). La radioterapia (quimioterapia) primaria se elige en estadios avanzados (estadio III y superiores), en casos con infiltración de los ganglios linfáticos o en casos en los que no se puede extirpar el tumor. La localización de la radiación se adapta en función de la infiltración ganglionar y la radiación se apoya con Cisplatino (S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 2014). Se ha demostrado que la radioterapia (quimioterapia) combinada con Cisplatino es beneficiosa en términos de supervivencia global (OS, por sus siglas en inglés) y supervivencia libre de progresión (PFS, por sus siglas en inglés) en comparación con la radioterapia sola. Cabe destacar que, las combinaciones con otras medicaciones no mejoraron OS o PFS en comparación con cisplatino solo pero aumentaron la toxicidad (Green et al., 2005; Wang et al., 2011; Lukka et al., 2002). En el tratamiento de recaídas locales, se han probado combinaciones de Cisplatino con otros fármacos y solo una combinación con Topotecán dio lugar a un perfeccionamiento de OS en comparación con Cisplatino solo (S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 2014).

También hay algunos enfoques inmunoterapéuticos que se están probando actualmente. En un ensayo clínico de fase I/II, pacientes que padecían cáncer de útero fueron vacunadas con células dendríticas (DC) autólogas sometidas a electroporación con ARNm del gen 1 del tumor de Wilms (WT1). Aparte de un caso de reacción alérgica local al adyuvante, no se observaron efectos secundarios adversos y 3 de 6 pacientes mostraron una respuesta inmunológica (Coosemans et al., 2013).

Como se ha indicado anteriormente, las infecciones por VPH provocan lesiones que, en última instancia, pueden desembocar en un cáncer de cuello uterino. Por lo tanto, las oncoproteínas víricas E6 y E7 del VPH, que se expresan de forma constitutiva en las lesiones de alto grado y en el cáncer y son necesarias para la aparición y el mantenimiento del fenotipo maligno, se consideran dianas prometedoras para los enfoques inmunoterapéuticos (Hung et al., 2008; Vici et al., 2014). Un estudio realizó una terapia de células T adoptivas (ACT, por sus siglas en inglés) en pacientes con cáncer de cuello de útero metastásico. Los pacientes reciben una infusión con células T infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés) reactivas a E6 y E7 que da como resultado una regresión completa en 2 y una respuesta parcial en 1 de 9 pacientes (Stevanovic et al., 2015). Adicionalmente, se informó de que un anticuerpo intracelular dirigido a E7 bloqueaba el crecimiento tumoral en ratones (Accardi et al., 2014). También las vacunas basadas en péptidos, ADN y DC dirigidas contra E6 y E7 del VPH están en fase de ensayo clínico (Vici et al., 2014).

Teniendo en cuenta los graves efectos secundarios y los gastos asociados al tratamiento del cáncer, existe la necesidad de identificar factores que puedan usarse en el tratamiento del cáncer en general y de cáncer uterino en particular. También es necesario identificar factores que representen biomarcadores del cáncer en general y de cáncer uterino en particular, conduciendo a un mejor diagnóstico del cáncer, evaluación del pronóstico y predicción del éxito del tratamiento. La inmunoterapia del cáncer representa una opción dirigida específicamente a las células cancerosas minimizando los efectos secundarios. La inmunoterapia contra el cáncer aprovecha la existencia de antígenos asociados a tumores.

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

- a) Antígenos de cáncer de testículo: Los primeros TAA identificados que pueden ser reconocidos por los linfocitos T pertenecen a esta clase, que originalmente se denominó antígenos de cáncer de testículo (CT) debido a la expresión de sus miembros en tumores humanos histológicamente diferentes y, entre los tejidos normales, solo en

espermatocitos/espermatogonias de testículo y, ocasionalmente, en placenta. Dado que las células de los testículos no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T en tejidos normales y, por lo tanto, pueden considerarse inmunológicamente específicos de tumores. Los ejemplos bien conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y NY-ESO-1.

b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA se comparten entre los tumores y el tejido normal del que surgió el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se encuentran en melanomas y melanocitos normales. Muchas de estas proteínas relacionadas con el linaje de los melanocitos están implicadas en la biosíntesis de melanina y, por lo tanto, no son específicas de tumores, pero, sin embargo, se usan ampliamente para la inmunoterapia del cáncer. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosinasa y Melan-A/MART-1 para el melanoma o PSA para el cáncer de próstata.

c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA ampliamente expresados en tipos histológicamente diferentes de tumores así como en muchos tejidos normales, generalmente con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítomos procesados y potencialmente presentados por los tejidos normales estén por debajo del nivel umbral para el reconocimiento de los linfocitos T, mientras que su sobreexpresión en células tumorales puede desencadenar una respuesta anticancerígena al romper la tolerancia previamente establecida. Los ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

d) Antígenos específicos de tumores: Estos TAA únicos surgen de mutaciones de genes normales (tales como β -catenina, CDK4, etc.). Algunos de estos cambios moleculares están asociados a transformación y/o progresión neoplásica. Los antígenos específicos de tumores generalmente pueden inducir fuertes respuestas inmunitarias sin correr el riesgo de reacciones autoinmunitarias contra tejidos normales. Por otra parte, en la mayoría de los casos estos TAA solo son relevantes para el tumor exacto en donde fueron identificados y, por lo general, no se comparten entre muchos tumores individuales. La especificidad (o asociación) del tumor de un péptido también puede surgir si el péptido se origina a partir de un exón (asociado) al tumor en el caso de proteínas con isoformas (asociadas) específicas del tumor.

e) TAA que surgen de modificaciones postraduccionales anormales: Dichos TAA pueden surgir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en tumores pero que, sin embargo, se asocian a tumores mediante procesos postraduccionales principalmente activos en tumores. Los ejemplos de esta clase surgen de patrones de glucosilación alterados que conducen a nuevos epítomos en tumores como MUC1 o eventos como el corte y empalme de proteínas durante la degradación que pueden ser o no específicos del tumor.

f) Proteínas oncovíricas: Estos TAA son proteínas víricas que pueden desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y, debido a que son extrañas (no de origen humano), pueden provocar una respuesta de linfocitos T. Son ejemplos de tales proteínas las proteínas del virus del papiloma humano tipo 16, E6 y E7, que se expresan en el carcinoma cervical.

La inmunoterapia basada en linfocitos T se dirige a epítomos peptídicos derivados de proteínas asociadas a tumores o específicas de tumores, los cuales son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos del tumor, esto es, sus epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación con células inalteradas del mismo origen, generalmente se regulan positivamente en las células del tumor respectivo.

Hay dos clases de moléculas del MHC, MHC de clase I y MHC de clase II. Las moléculas del MHC de clase I están compuestas por una cadena pesada alfa y una microglobulina beta-2, las moléculas del MHC de clase II por una cadena alfa y una beta. Su conformación tridimensional da como resultado un surco de unión, que se usa para la interacción no covalente con péptidos.

Las moléculas de MHC de clase I pueden encontrarse en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos que resultan de la escisión proteolítica de proteínas predominantemente endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos más grandes. Sin embargo, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia en las moléculas del MHC de clase I. Esta forma no clásica de presentación de clase I se conoce como presentación cruzada en la bibliografía (Brossart y Bevan, 1997; Rock *et al.*, 1990). Las moléculas del MHC de clase II pueden encontrarse predominantemente en células presentadoras de antígenos (APC) profesionales, y presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC, por ejemplo, durante la endocitosis y posteriormente se procesan.

Los complejos de péptido y MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8 positivos que llevan el receptor de linfocitos T (TCR) apropiado, mientras que los complejos de péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T auxiliares CD4 positivos que portan el TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes de esta manera en una cantidad estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T auxiliares CD4 positivos desempeñan un papel importante en la inducción y el mantenimiento de respuestas efectivas por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8 positivos. La identificación de epítomos de linfocitos T CD4 positivos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) es de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic *et al.*, 2003). En el sitio del tumor, los linfocitos T auxiliares, soportan un entorno de citocinas amigable con los linfocitos T citotóxicos (CTL)

(Mortara *et al.*, 2006) y atraen células efectoras, por ejemplo, CTL, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos y granulocitos (Hwang *et al.*, 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas del MHC de clase II está restringida principalmente a las células del sistema inmunitario, especialmente células presentadoras de antígenos profesionales (APC), por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos, células dendríticas. En pacientes con cáncer, se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel *et al.*, 2006).

Los péptidos alargados (más largos) desvelados en el presente documento pueden actuar como epítomos activos del MHC de clase II. Los linfocitos T colaboradores, activados por epítomos del MHC clase II, desempeñan un papel importante en la orquestación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos de linfocitos T colaboradores que desencadenan una respuesta de linfocitos T colaboradores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citolíticos CD8 positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra células tumorales que muestran complejos de péptido asociado a tumores/MHC en sus superficies celulares. De esta manera, los epítomos peptídicos de linfocitos T colaboradores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios farmacéuticos activos de composiciones de vacunas que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales.

Se demostró en modelos animales mamíferos, por ejemplo, ratones, que incluso en ausencia de linfocitos T CD8 positivos, los linfocitos T CD4 positivos son suficientes para inhibir la manifestación de tumores mediante la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN γ) (Beatty y Paterson, 2001; Mumberg *et al.*, 1999). Existe evidencia de que los linfocitos T CD4 son efectores antitumorales directos (Braummuller *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele limitarse a las células inmunitarias, hasta ahora no se consideraba posible la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios. Sin embargo, Dengjel *et al.* lograron identificar varios epítomos de MHC de Clase II directamente de tumores (documento WO 2007/028574, documento EP 1 760 088 B1).

Dado que ambos tipos de respuesta, dependiente de CD8 y de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y la caracterización de antígenos asociados a tumores reconocidos por linfocitos T CD8+ (ligando: molécula de MHC de clase I + epítipo peptídico) o por linfocitos T colaboradores CD4 positivos (ligando: molécula de MHC de clase II + epítipo peptídico) es importante en el desarrollo de vacunas tumorales.

Para que un péptido MHC de clase I desencadene (provoque) una respuesta inmunitaria celular, también debe unirse a una molécula del MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos de unión al MHC de clase I suelen tener 8-12 restos de aminoácidos de longitud y normalmente contienen dos restos conservados ("anclas") en su secuencia que interactúan con el surco de unión correspondiente de la molécula del MHC. De esta manera, cada alelo del MHC tiene un "motivo de unión" que determina qué péptidos pueden unirse específicamente al surco de unión.

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

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumores y puedan usarse en una terapia, deben cumplirse determinados requisitos previos. El antígeno debería ser expresado principalmente por células tumorales y no, o en cantidades comparativamente pequeñas, por tejidos sanos normales. En una realización preferida, el péptido debe estar sobrerrepresentado por las células tumorales en comparación con los tejidos sanos normales. Además es deseable que el antígeno respectivo no solo esté presente en un tipo de tumor, sino también en altas concentraciones (es decir, número de copias del péptido respectivo por célula). Los antígenos específicos de tumores y asociados a tumores a menudo derivan de proteínas directamente implicadas en la transformación de una célula normal en una célula tumoral debido a su función, por ejemplo, en el control del ciclo celular o la supresión de la apoptosis. Adicionalmente, las dianas posteriores de las proteínas que provocan directamente una transformación pueden estar reguladas positivamente y, por lo tanto, pueden estar indirectamente asociadas a tumores. Estos antígenos indirectos asociados a tumores también pueden ser dianas de un enfoque de vacunación (Singh-Jasuja *et al.*, 2004). Es esencial que los epítomos estén presentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno, para garantizar que dicho péptido ("péptido inmunogénico"), que deriva de un antígeno asociado a un tumor y provoca una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo*.

El documento US 2009/264357 A1 se refiere a métodos y composición para inhibir la angiogénesis y la metástasis de células cancerosas usando Mx1 o ácidos nucleicos que codifican el mismo. El documento US 2007/021337 A1 se refiere al uso de la proteína Mx1 y ácidos nucleicos que codifican el mismo para inducir la apoptosis.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede funcionar como un epítipo de célula T. Un prerrequisito para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T

que tiene un TCR correspondiente y la ausencia de tolerancia inmunológica para este epítipo particular.

Por lo tanto, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T que incluye pero no se limita a vacunas contra tumores. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA se basan habitualmente en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o sujetos sanos, o se basan en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre tumores y tejidos normales. Sin embargo, la identificación de genes sobreexpresados en tejidos tumorales o líneas celulares tumorales humanas, o expresados selectivamente en dichos tejidos o líneas celulares, no proporciona información precisa sobre el uso de los antígenos que se transcriben a partir de estos genes en una inmunoterapia. Esto se debe a que solo una subpoblación individual de epítopos de estos antígenos es adecuada para dicha aplicación, ya que debe estar presente una célula T con un TCR correspondiente y la tolerancia inmunológica para este epítipo particular debe estar ausente o ser mínima. En un ejemplo, es por lo tanto importante seleccionar solo aquellos péptidos presentados excesiva o selectivamente contra los cuales se puede encontrar una célula T funcional y/o proliferante. Una célula T funcional de este tipo se define como una célula T, que tras la estimulación con un antígeno específico puede expandirse clonalmente y es capaz de ejecutar funciones efectoras ("linfocitos T efectores").

En caso de dirigirse al péptido-MHC mediante TCR específicos (por ejemplo, TCR solubles) y anticuerpos u otras moléculas de unión (andamios) desvelados en el presente documento, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En estos casos, la presentación es el factor determinante.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención también se refiere a un receptor de células T recombinante, soluble o unido a la membrana que es reactivo con un ligando HLA, en donde dicho ligando consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma. La presente invención también se refiere a un anticuerpo, soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, que codifica el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o codificar el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido. La presente invención también se refiere a un vector de expresión que expresa este ácido nucleico.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una célula hospedadora recombinante que comprende el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, o el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o que codifica el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido, o un vector de expresión que expresa el ácido nucleico.

La presente invención también se refiere a un método para producir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, o para producir el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido. El método comprende el cultivo de la célula hospedadora que comprende dicho péptido, o el ácido nucleico que codifica dicho péptido, que codifica dicho receptor de células T o que codifica dicho anticuerpo, o un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, la célula hospedadora que presenta dicho péptido o expresa dicho ácido nucleico o vector de expresión. El método comprende además aislar el péptido o el TCR o el anticuerpo de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados. El método comprende poner en contacto *in vitro* células T con moléculas de MHC de clase I humano cargadas de antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dichas células T de una manera específica para el antígeno. El antígeno es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma.

La presente invención también se refiere a un linfocito T activado, producido mediante el método anterior. El linfocito T activado reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende la secuencia de

aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o codificar el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido, un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, la célula que comprende el péptido o el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T o que codifica el anticuerpo, o que comprende un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, el linfocito T activado que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, el anticuerpo o el receptor de células T. La composición farmacéutica también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a un kit. El kit incluye un primer recipiente que comprende una composición farmacéutica. La composición farmacéutica contiene el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma, el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o codificar el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido, un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, la célula que comprende el péptido o el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T o que codifica el anticuerpo, o que comprende un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, el linfocito T activado que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, el anticuerpo o el receptor de células T. El kit también incluye un segundo recipiente que contiene un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada.

La presente invención se refiere adicionalmente al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma, el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T que es reactivo con dicho péptido como un ligando HLA, o codificar el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido, el vector de expresión que expresa el ácido nucleico, la célula que comprende el péptido o el ácido nucleico que codifica el péptido, que codifica el receptor de células T o que codifica el anticuerpo, o que comprende un vector de expresión que expresa el ácido nucleico, el linfocito T activado que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, el anticuerpo o el receptor de células T para su uso en el tratamiento del cáncer uterino.

La presente invención también se refiere al uso del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal del mismo, o el anticuerpo que reconoce específicamente el péptido, 5 en el diagnóstico *in vitro* del cáncer uterino.

Se desvela también un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54 o una secuencia variante de las mismas que es al menos el 77 %, preferentemente al menos el 88 %, homóloga (preferentemente al menos el 77 % o al menos el 88 % idéntica) a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54, en donde dicha variante se une al MHC y/o induce una reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde dicho péptido no es el polipéptido de longitud completa subyacente.

También se ha desvelado un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a 11 y SEQ ID NO: 13 a 54 o una variante de las mismas, que es al menos el 77 %, preferentemente al menos el 88 %, homóloga (preferentemente al menos el 77 % o al menos el 88 % idéntica) a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54, en donde dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente entre 8 y 30 y lo más preferido entre 8 y 14 aminoácidos.

Las siguientes tablas muestran los péptidos desvelados en el presente documento, sus respectivas SEQ ID NO y los posibles genes fuente (subyacentes) de estos péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 y la Tabla 2 se unen a HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 2 se han desvelado anteriormente en listados grandes como resultados de cribados de alto rendimiento con altas tasas de error o calculados mediante algoritmos, pero no se han asociado en absoluto con el cáncer antes. Los péptidos en la Tabla 3 son péptidos adicionales que pueden ser útiles junto con los otros péptidos de la divulgación. Los péptidos en la Tabla 4 son adicionalmente útiles en el diagnóstico y/o el tratamiento de diversas otras neoplasias malignas que implican una sobreexpresión o sobrerepresentación del respectivo polipéptido subyacente.

ES 3 005 964 T3

Tabla 1: Péptidos de acuerdo con la presente divulgación.

SEQ ID NO	Secuencia	ID del gen	Símbolos génicos oficiales
1	KLLDNLHDL	5241	PGR
2	VLLDIFTGV	3980	LIG3
3	GLDGATYTV	54910	SEMA4C
4	RLDIQGTGQLL	5284	PIGR
5	SLFDEVQRQI	53407	STX18
6	SLLSELVEA	57542	KLHDC5
7	SILSLLIKL	130507	UBR3
8	SVMELLQGV	85363	TRIM5
9	SLYPGTETM	6840	SVIL
10	AILDVVVNL	5991	RFX3
11	ALDPIIHGL	5793	PTPRG
12	ALAPSEGVQAA	4487	MSX1
13	ALQNKVVAL	158046	NXNL2
14	FLVDSLISA	3236	HOXD10
15	GLLSVELRV	54798	DCHS2
16	KLNSSIQYV	93035	PKHD1L1
17	KLWEESTAQV	127254	C1orf173
18	SLLRCPAKA	1409	CRYAA
19	YLETMNITL	283209	PGM2L1
20	ALLGFVTDL	493	ATP2B4
21	VLGPEGQLV	219970	GLYATL2
22	VLVSSVLGV	59307	SIGIRR
23	GLGPNLVGV	55186, 653698, 84275	SLC25A36, SLC25A33
24	ILDAQTAQV	4363	ABCC1
25	ILLELFTHV	26270, 93611	FBXO6, FBXO44
26	SVLAGVVG	2977	GUCY1A2
27	VLNPETTVV	9061	PAPSS1
28	GLDEAIRKV	219970	GLYATL2
29	IGIGPVLNI	55217	TMLHE
30	TLLDRVAVI	100996779, 283788, 284802	FRG1B
31	ALLTAVTNV	221496	LEMD2
32	GLIENTYQL	285533	RNF175
33	SMTTNLDLKV	338949	TMEM202
34	AIAGRLLGV	1184	CLCN5
35	TLLPTLYEI	285671	RNF180
36	SLLSDIAL	9091	PIGQ

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	ID del gen	Símbolos génicos oficiales
37	VLLATVTEL	79939	SLC35E1
38	RILDIDIPLSV	29842	TFCP2L1
39	ALDGKIYEL	394	ARHGAP5
40	GLLGGVIMMV	7922	SLC39A7
41	YIDDIFSGV	374618	TEX9
42	FLSGYYVTL	84336	TMEM101
43	VIANEIEKV	80832	APOL4
44	FLNGLEILL	23195	MDN1
45	VLLHVSVLL	254359	ZDHHC24

Tabla 2: Péptidos adicionales desvelados en el presente documento sin asociación previa conocida con el cáncer.

SEQ ID NO	Secuencia	ID del gen	Símbolos génicos oficiales
46	NMDDVIYYV	153830	RNF145
47	GLVEQLYDL	26155, 401010	NOC2L
48	ILAETQPEL	53407	STX18
49	ALLELLHEL	221496	LEMD2
50	TLSTVIATV	1822	ATN1
51	TVPPVFVSV	3778	KCNMA1
52	ALISEKLETL	54431	DNAJC10
53	VMHDSSFSV	22850	ADNP2
54	TLSDVVVGL	26610	ELP4

5

Tabla 3: Péptidos útiles para, por ejemplo, terapias personalizadas contra el cáncer.

J = fosfo-serina			
SEQ ID NO	Secuencia	ID del gen	Símbolos génicos oficiales
55	KIDEKNFVV	5887	RAD23B
56	LLLEILHEI	30001	ERO1L
57	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
58	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
59	QLLAGVFLA	3371	TNC
60	KLFNEFIQL	10885	WDR3
61	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
62	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
63	RLLJAAENFL	64092	SAMSN1
64	ALYDSVILL	1734	DIO2
65	GLAPGGGLAVV	58525	WIZ
66	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
67	ALQPLLHTV	54756	IL17RD

(continuación)

J = fosfo-serina			
SEQ ID NO	Secuencia	ID del gen	Símbolos génicos oficiales
68	SLAEVNTQL	11190	CEP250
69	VLTEFTREV	55705	IPO9
70	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
71	SLHNGVIQL	1314	COPA

Se desvelan además los péptidos para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML), cáncer de mama, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (HCC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y cáncer de vejiga urinaria.

- 10 También se han desvelado los péptidos, solos o en combinación, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54. Se desvelan además los péptidos, solos o en combinación, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 19 (véase la Tabla 1), y sus usos en la inmunoterapia del cáncer uterino, leucemia mielógena aguda (AML), cáncer de mama, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (HCC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (CPCP) y cáncer de vejiga urinaria y preferentemente cáncer uterino.

- 20 Como se muestra en la siguiente Tabla 4A y 4B, muchos de los péptidos desvelados en el presente documento se encuentran también en otros tipos de tumores y pueden, por lo tanto, usarse también en la inmunoterapia de otras indicaciones. Véanse también la Figura 1 y el Ejemplo 1.

- 25 Tabla 4A: Péptidos desvelados y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas. La tabla muestra, para los péptidos seleccionados, en qué tipos de tumores adicionales se encontraron y o bien estaban sobrerrepresentados en más del 5 % de las muestras tumorales medidas, o bien se presentaban en más del 5 % de las muestras tumorales medidas con una relación de medias geométricas de tumor frente a tejidos normales superior a tres. La sobrerrepresentación se define como una mayor presentación en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal de mayor presentación. Los tejidos normales contra los que se probó la sobrerrepresentación fueron: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, nervio central, colon, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos, páncreas, glándula paratiroidea, nervio periférico, peritoneo, hipófisis, pleura, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter, vejiga urinaria, vena.

SEQ ID NO:	Secuencia	Otros órganos / enfermedades relevantes
1	KLLDNLHDL	HCC, BRCA
2	VLLDIFTGV	Cáncer de cerebro, HCC, PrC, AML, OC, Cáncer de vejiga urinaria
3	GLDGATYTV	SCLC, RCC, HCC, PrC, NHL, BRCA, Melanoma, Cáncer de vejiga urinaria
6	SLLSELVEA	NSCLC, RCC, Cáncer de cerebro, PrC, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, OC, Cáncer de vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
7	SILSLLIKL	SCLC, AML, Cáncer de vejiga urinaria
8	SVMELLQGV	SCLC, HCC, PrC, CLL, AML, Melanoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
9	SLYPGTETM	AML, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
10	AILDVVVN	SCLC, Cáncer de cerebro, NHL, AML
11	ALDPPIHGL	Cáncer de cerebro, Melanoma
14	FLVDLSISA	HCC
15	GLLSVELRV	AML

ES 3 005 964 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Otros órganos / enfermedades relevantes
17	KLWEESTAQV	OC
20	ALLGFVTDL	Cáncer de cerebro, NHL, AML, Cáncer de vejiga urinaria
21	VLGPEGQLV	BRCA
22	VLVSSVLGV	AML
23	GLGPNLVGV	SCLC, Cáncer de cerebro, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, Cáncer de vejiga urinaria
24	ILDAQTAFV	NSCLC, RCC, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, Cáncer de vejiga urinaria
25	ILLELFTHV	NSCLC, CRC, CLL, Cáncer de vejiga urinaria
27	VLNPETTVV	Cáncer de cerebro, AML, Melanoma, Cáncer de vejiga urinaria
28	GLDEAIRKV	BRCA
29	IGIGPVLNI	Cáncer de cerebro, HCC, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, OC, Cáncer de vejiga urinaria
30	TLLDRVAVI	RCC, CLL, AML, Cáncer de vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
31	ALLTAVTNV	HCC, BRCA
32	GLIENTYQL	RCC, NHL, AML, BRCA, Melanoma
34	AIAGRLLGV	Melanoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
35	TLLPTLYEI	SCLC, Cáncer de cerebro, PC, PrC, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
36	SLLSDIAL	Cáncer de cerebro, HCC, PrC, AML, BRCA, Cáncer de vejiga urinaria
37	VLLATVTEL	SCLC, NHL, BRCA, Melanoma
39	ALDGKIYEL	Melanoma
40	GLLGGVIMMV	NSCLC, SCLC, Cáncer de cerebro, CRC, HCC, PrC, NHL, AML, MCC, Melanoma, Cáncer de vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
41	YIDDIFSGV	Melanoma
42	FLSGYYVTL	AML, Melanoma
43	VIANEIEKV	PrC, Cáncer esofágico, Cáncer de vejiga urinaria
44	FLNGLEILL	CLL, NHL, AML
45	VLLHVSVLL	PC, BRCA
46	NMDDVIYYV	NHL, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
47	GLVEQLYDL	SCLC, CLL, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico
49	ALLELLHEL	SCLC, HCC, PrC, MCC
50	TLSTVIATV	PrC, Melanoma
51	TVPPVFVSV	RCC, CRC, HCC
52	ALISEKLETL	CLL, NHL, AML, BRCA, Melanoma
53	VMHDSSFVS	NSCLC, SCLC, Cáncer de cerebro, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar
54	TLSDVVVGL	Cáncer de cerebro, HCC, PrC, CLL, NHL, AML, BRCA, Melanoma, Cáncer esofágico, OC, Cáncer de vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del conducto biliar

NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico, SCLC = cáncer de pulmón microcítico, RCC = cáncer de riñón, CRC = cáncer de colon o recto, GC = cáncer de estómago, HCC = cáncer de hígado, PC = cáncer pancreático, PrC = cáncer de próstata, leucemia, BrCa = cáncer de mama, MCC = carcinoma de células de Merkel, OC = cáncer ovárico, NHL = linfoma no hodgkiniano, AML = leucemia mielógena aguda

Tabla 4B: Péptidos desvelados y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas. La tabla muestra, para los péptidos seleccionados, en qué tipos de tumores adicionales se encontraron y o bien estaban sobrerepresentados en más del 5 % de las muestras tumorales medidas, o bien se presentaban en más del 5 % de las muestras tumorales medidas con una relación de medias geométricas de tumor frente a tejidos normales superior a tres. La sobrerepresentación se define como una mayor presentación en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal de mayor presentación. Los tejidos normales contra los que se probó la sobrerepresentación fueron: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, nervio central, colon, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos, páncreas, glándula paratiroidea, nervio periférico, peritoneo, hipófisis, pleura, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter, vejiga urinaria, vena.

SEQ ID NO	Secuencia	Entidades adicionales
2	VLLDIFTGV	SCLC
8	SVMELLQGV	NSCLC, HNSCC
9	SLYPGTETM	PrC, Melanoma
24	ILDAQTAFV	PrC, HNSCC
27	VLNPETTVV	SCLC
29	IGIGPVLNI	PC
30	TLLDRVAVI	CRC, NHL, HNSCC
39	ALDGKIYEL	HCC
47	GLVEQLYDL	HNSCC
50	TLSTVIATV	Cáncer de cerebro
53	VMHDSSFSV	Cáncer esofágico, HNSCC
54	TLSDVVVGL	Cáncer esofágico
NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico, SCLC = cáncer de pulmón microcítico, CRC = cáncer de colon o recto, HCC = cáncer de hígado, PC = cáncer pancreático, PrC = cáncer de próstata, HNSCC= cáncer de cabeza y cuello		

También se desvela el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 8, 14, 29, 31, 36, 39, 40, 49, 51 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de HCC.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 6, 21, 23, 24, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 45, 47, 52, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de BRCA.

Se desvela también el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 11, 20, 23, 27, 29, 35, 36, 40, 50, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de cáncer de cerebro.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 8, 9, 24, 35, 36, 40, 43, 49, 50 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de PrC.

También se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 40, 42, 44, 47, 52, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de AML.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 6, 17, 29 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de OC.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7, 20, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 36, 40, 43 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de cáncer de vejiga urinaria.

También se desvela el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 7, 8, 10, 23, 27, 35, 37, 40, 47, 49 y 53 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de SCLC.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 6, 24, 30, 32 y 51 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de RCC.

Se desvela también el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 6, 10, 20, 23, 24, 29, 30, 32, 37, 40, 44, 46, 47, 52, y 54, para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de NHL.

También se desvela el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 6, 8, 9, 11, 23, 24, 27, 29, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 47, 50, 52, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de melanoma.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 23, 24, 29, 43, 47, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de cáncer esofágico.

También se desvela el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 8, 24, 25, 40 y 53 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de NSCLC.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido desvelado en el presente documento de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 6, 8, 9, 30, 34, 35, 40, 46, 53 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar.

Se desvela también el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 25, 30, 44, 47, 52 y 54 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de CLL.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 25, 30, 40 y 51 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de CRC.

Se desvela también el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 29, 35 y 45 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de PC.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 24, 30 y 53 para el tratamiento, en un ejemplo preferido combinado, de HNSCC.

Se desvela adicionalmente el uso de los péptidos para el tratamiento, preferentemente combinado, de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo de cáncer uterino, leucemia mielógena aguda (AML), cáncer de mama, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (HCC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y cáncer de vejiga urinaria.

Adicionalmente, se desvelan péptidos desvelados en el presente documento que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o, en una forma alargada, tal como una variante de longitud, MHC de clase II.

También se desvelan los péptidos desvelados en el presente documento en donde dichos péptidos (cada uno) consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54.

También se han desvelado los péptidos, en donde dicho péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

Se desvelan además los péptidos desvelados en el presente documento, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionado a los aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionado a (o en la secuencia de) un anticuerpo, tales como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para las células dendríticas.

Se desvela adicionalmente un ácido nucleico, que codifica los péptidos desvelados en el presente documento. Se desvela también el ácido nucleico desvelado en el presente documento que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos.

Se desvela además un vector de expresión capaz de expresar y/o manifestar un ácido nucleico desvelado en el presente documento.

Se desvela además un péptido desvelado en el presente documento, un ácido nucleico desvelado en el presente documento o un vector de expresión desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular, en el tratamiento de cáncer.

También se desvelan anticuerpos que son específicos contra los péptidos desvelados en el presente documento o

complejos de dichos péptidos desvelados en el presente documento con MHC, y métodos para fabricarlos.

También se han desvelado los receptores de células T (TCR), en particular TCR solubles (sTCR) y TCR clonados diseñados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y métodos para producirlos, así como células NK u otras células que portan dicho TCR o que reaccionan de forma cruzada con dichos TCR.

Los anticuerpos y los TCR son ejemplos adicionales del uso inmunoterapéutico de los péptidos desvelados en el presente documento.

También se desvela una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico desvelado en el presente documento o un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Se desvela además la célula hospedadora desvelada en el presente documento que es una célula presentadora de antígenos y preferentemente es una célula dendrítica.

Se desvela adicionalmente un método para producir un péptido desvelado en el presente documento, comprendiendo dicho método cultivar la célula hospedadora desvelada en el presente documento y aislar el péptido de dicha célula hospedadora o su medio de cultivo.

Se desvela también dicho método desvelado en el presente documento, en donde el antígeno se carga en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o de una célula presentadora de antígeno artificial poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Se desvela adicionalmente el método desvelado en el presente documento, en donde la célula presentadora de antígenos comprende un vector de expresión capaz de expresar o expresar dicho péptido que contiene SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO: 54, preferentemente que contiene SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO: 19, o una secuencia de aminoácidos variante.

También se han desvelado células T activadas, producidas por los métodos desvelados en el presente documento, en donde dichas células T reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente divulgación.

Se desvela además un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento, comprendiendo el método administrar al paciente un número eficaz de linfocitos T producidos de acuerdo con la presente divulgación.

Se desvela además el uso de cualquier péptido como se ha descrito, el ácido nucleico desvelado en el presente documento, el vector de expresión desvelado en el presente documento, la célula desvelada en el presente documento, el linfocito T activado, el receptor de linfocitos T o el anticuerpo u otro péptido y/o moléculas de unión a péptido-MHC desvelados en el presente documento como un medicamento o en la fabricación de un medicamento. Preferentemente, dicho medicamento es activo contra el cáncer.

Preferentemente, dicho medicamento es una terapia celular, una vacuna o una proteína basada en un TCR o anticuerpo soluble.

Se desvela también un uso como se ha desvelado en el presente documento, en donde dichas células cancerosas son cáncer uterino, leucemia mielógena aguda (AML), cáncer de mama, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (HCC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (CPCP) y cáncer de vejiga urinaria y preferentemente células de cáncer uterino.

Se desvelan biomarcadores adicionales basados en los péptidos desvelados en el presente documento, en el presente documento llamados "diana" que pueden usarse en el diagnóstico de cáncer, preferentemente cáncer uterino. El marcador puede ser una sobrepresentación del propio o propios péptidos o una sobreexpresión del gen o genes correspondientes. Los marcadores también pueden usarse para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferentemente una inmunoterapia, y más preferentemente una inmunoterapia dirigida a la misma diana identificada por el biomarcador. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo o un TCR soluble para tefir secciones del tumor para detectar la presencia de un péptido de interés en complejo con MHC.

Opcionalmente el anticuerpo porta una función efectora adicional tal como un dominio o toxina inmunoestimulante.

Se desvela adicionalmente el uso de estas dianas novedosas en el contexto del tratamiento del cáncer.

Descripción detallada de la invención

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha planteado la posibilidad de usar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir en el crecimiento del tumor. Actualmente se están explorando varios mecanismos para aprovechar los brazos humoral y celular del sistema

5 inmunitario para la inmunoterapia contra el cáncer.

Los elementos específicos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T de poblaciones de células infiltrantes de tumores o de sangre periférica sugiere que dichas células desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el

10 cáncer. En particular, los linfocitos T CD8 positivos, que reconocen moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que contienen péptidos de normalmente 8 a 10 restos de aminoácidos derivados de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) ubicados en el citosol, juegan un papel importante en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

La expresión "respuesta de linfocitos T" significa la proliferación y activación específicas de funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. Para los linfocitos T citotóxicos restringidas por MHC de clase I, las funciones efectoras pueden ser la lisis de células diana pulsadas con péptidos, pulsadas con precursores de péptidos o presentadoras naturales de péptidos, secreción de citocinas, preferentemente interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido, secreción de moléculas efectoras, preferentemente granzimas o perforinas inducidas por péptido

20 o desgranulación.

El término "péptido" se usa en el presente documento para designar una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes.

25

Adicionalmente, el término "péptido" incluirá sales de una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, tal como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Cabe señalar que las sales de los péptidos desvelados en el presente

30 documento difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, ya que los péptidos no son sales *in vivo*.

El término "péptido" incluirá también "oligopéptido". El término "oligopéptido" se usa en el presente documento para designar una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crítica, siempre y cuando se mantengan en el mismo el epítipo o epítipos correctos. Los oligopéptidos normalmente tienen menos de aproximadamente 30 restos de aminoácidos de longitud y más de aproximadamente 15 aminoácidos de longitud.

35

El término "polipéptido" designa una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica siempre que se mantengan los epítipos correctos. A diferencia de los términos péptido u oligopéptido, el término polipéptido pretende referirse a moléculas que contienen más de aproximadamente 30 restos de aminoácidos.

40

Un péptido, un oligopéptido, una proteína o un polinucleótido que codifica dicha molécula es "inmunógeno" (y por lo tanto es un "inmunógeno" dentro de la presente divulgación), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad de inducir una respuesta de 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 divulgación, una molécula capaz de inducir una respuesta de linfocitos T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, el oligopéptido y/o la proteína que se usa para generar anticuerpos específicos o TCR contra él.

45

Un "epítipo" de célula T de clase I requiere un péptido corto que está unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa del MHC clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por una célula T que porta un receptor de linfocitos T coincidente que se une al complejo MHC/péptido con afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase I tienen normalmente entre 8 y 14 aminoácidos de longitud y lo más habitual es que tengan una longitud de 9 aminoácidos.

55

En seres humanos existen tres loci genéticos diferentes que codifican 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 diferentes alelos del MHC de clase I que pueden expresarse a partir de estos loci.

60

Tabla 1: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos HLA-DR más frecuentes. Las frecuencias se deducen de las frecuencias del haplotipo Gf dentro de la población estadounidense adaptadas de Mori et al. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían enriquecerse o ser menos frecuentes de lo esperado a partir de sus frecuencias únicas debido a un desequilibrio de enlace. Para más detalles consúltese Chanock *et al.* (Chanock *et al.*, 2004).

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásico (Norte América)	49,1 %
A*02	Afroamericano (Norte América)	34,1%
A*02	Asiático americano (Norte América)	43,2%
A*02	Latinoamericano (norteamericano)	48,3%
DR1	Caucásico (Norte América)	19,4%
DR2	Caucásico (Norte América)	28,2%
DR3	Caucásico (Norte América)	20,6%
DR4	Caucásico (Norte América)	30,7%
DR5	Caucásico (Norte América)	23,3%
DR6	Caucásico (Norte América)	26,7%
DR7	Caucásico (Norte América)	24,8%
DR8	Caucásico (Norte América)	5,7%
DR9	Caucásico (Norte América)	2,1%
DR1	Afro (norte) americano	13,20%
DR2	Afro (norte) americano	29,80%
DR3	Afro (norte) americano	24,80%
DR4	Afro (norte) americano	11,10%
DR5	Afro (norte) americano	31,10%
DR6	Afro (norte) americano	33,70%
DR7	Afro (norte) americano	19,20%
DR8	Afro (norte) americano	12,10%
DR9	Afro (norte) americano	5,80%
DR1	Asiático (norte) americano	6,80%
DR2	Asiático (norte) americano	33,80%
DR3	Asiático (norte) americano	9,20%
DR4	Asiático (norte) americano	28,60%
DR5	Asiático (norte) americano	30,00%
DR6	Asiático (norte) americano	25,10%
DR7	Asiático (norte) americano	13,40%
DR8	Asiático (norte) americano	12,70%
DR9	Asiático (norte) americano	18,60%
DR1	Latino (norte) americano	15,30%
DR2	Latino (norte) americano	21,20%

(continuación)

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia alélica
DR3	Latino (norte) americano	15,20%
DR4	Latino (norte) americano	36,80%
DR5	Latino (norte) americano	20,00%
DR6	Latino (norte) americano	31,10%
DR7	Latino (norte) americano	20,20%
DR8	Latino (norte) americano	18,60%
DR9	Latino (norte) americano	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	Rusia Samara	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, preferentemente cuando se incluye en una vacuna de la invención como se describe en el presente documento se une a A*02. Una vacuna también puede incluir péptidos de MHC de clase II de unión total. Por lo tanto, la vacuna como se desvela en el presente documento puede usarse para tratar cáncer en pacientes que son positivos para A*02, mientras que no es necesaria ninguna selección de alotipos de MHC de clase II debido a la naturaleza de unión total de estos péptidos.

Si los péptidos A*02 de la divulgación se combinan con péptidos que se unen a otro alelo, por ejemplo, A*24, puede tratarse un porcentaje mayor de cualquier población de pacientes en comparación con abordar cualquiera de los alelos del MHC de clase I solos. Aunque en la mayoría de las poblaciones menos del 50 % de los pacientes podrían tratarse con cualquiera de los alelos solos, una vacuna que comprende los epítomos HLA-A*24 y HLA-A*02 puede tratar al menos al 60 % de los pacientes en cualquier población relevante. Específicamente, los siguientes porcentajes de pacientes serán positivos para al menos uno de estos alelos en varias regiones: EE.UU. 61 %, Europa occidental 62 %, China 75 %, Corea del Sur 77 %, Japón 86 % (calculado a partir de www.allelefreqencies.net).

En una realización preferida, la expresión "secuencia de nucleótidos" se refiere a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

La secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, un oligopéptido o un polipéptido particulares puede ser de origen natural o puede construirse sintéticamente. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas como se ha descrito en el presente documento se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y enlaces de oligonucleótidos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que sea capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

Como se usa en el presente documento la expresión "un nucleótido que codifica un péptido" se refiere a una secuencia

de nucleótidos que codifica el péptido que incluye codones de inicio y parada artificiales (hechos por el ser humano) compatibles con el sistema biológico mediante el cual va a expresarse la secuencia, por ejemplo, una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

5 Como se usa en el presente documento, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, por ejemplo, para el ADN, la secuencia específica, salvo que el contexto indique lo contrario, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, el dúplex de dicha secuencia con su complemento (ADN bicatenario) y el complemento de dicha secuencia.

10 La expresión "región codificante" se refiere a esa parte de un gen que codifica natural o normalmente el producto de expresión de ese gen en su entorno genómico natural, es decir, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión nativo del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado ("normal"), mutado o alterado, o incluso puede derivar de una secuencia de ADN, o gen, sintetizado íntegramente en el laboratorio usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia de la síntesis de ADN.

La expresión "producto de expresión" significa el polipéptido o proteína que es el producto de traducción natural del gen y cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y que, por lo tanto, codifique el mismo o los mismos aminoácidos.

El término "fragmento", cuando se hace referencia a una secuencia codificante, significa una porción de ADN que comprende menos de la región codificante completa, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma función o actividad biológica que el producto de expresión de la región codificante completa.

La expresión "segmento de ADN" se refiere a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de una construcción de ADN más grande, que ha derivado de ADN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales contaminantes endógenos y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y las secuencias de nucleótidos que lo componen mediante métodos bioquímicos convencionales, por ejemplo, usando un vector de clonación. Dichos segmentos se proporcionan en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido mediante secuencias internas no traducidas, o intrones, que están normalmente presentes en genes eucariotas. Pueden estar presentes secuencias de ADN no traducido posteriormente al marco de lectura abierto, donde los mismos no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término "cebador" significa una secuencia corta de ácido nucleico que puede emparejarse con una cadena de ADN y proporciona un extremo 3'-OH libre en donde una ADN polimerasa inicia la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

El término "promotor" significa una región del ADN implicada en la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el medio natural, si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y seguir estando aislados en el sentido de que dicho vector o composición no forme parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos y los polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, desvelados en el presente documento también pueden estar en forma "purificada". El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, pretende ser una definición relativa y puede incluir preparaciones que están altamente purificadas o preparaciones que están solo parcialmente purificadas, como los expertos en la materia relevante entienden esos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una biblioteca de ADNc se han purificado convencionalmente hasta homogeneidad electroforética. Purificación del material de partida o material natural hasta al menos un orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes, y más preferentemente cuatro o cinco órdenes de magnitud se contempla expresamente. Adicionalmente, un polipéptido reivindicado que tiene una pureza de preferentemente el 99,999 %, o al menos el 99,99 % o el 99,9 %, e incluso deseablemente el 99 % en peso o más se incluye expresamente.

Los ácidos nucleicos y los productos de expresión polipeptídica desvelados en el presente documento, así como vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, puede estar en "forma enriquecida". Como se usa en el presente documento, el término "enriquecido" significa que la concentración del material es al menos aproximadamente 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), ventajosamente el 0,01 %, en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 0,1 % en peso. Las preparaciones enriquecidas de aproximadamente el 0,5 %, el 1 %, el 5 %, el 10 % y el 20 % en peso también se contemplan. Las secuencias, las construcciones, los vectores, los clones y otros materiales que comprenden la presente divulgación

pueden estar ventajosamente en forma enriquecida o aislada. La expresión "fragmento activo" significa un fragmento, habitualmente de una secuencia peptídica, polipeptídica o de ácido nucleico, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, tiene actividad inmunogénica) cuando se administra, solo u opcionalmente con un adyuvante adecuado o en un vector, a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un conejo o un ratón, incluyendo también un ser humano, tomando dicha respuesta inmunitaria la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T dentro del animal receptor, tal como un ser humano. Alternativamente, el "fragmento activo" también puede usarse para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, los términos "parte", "segmento" y "fragmento", cuando se usan en relación con polipéptidos, se refieren a una secuencia continua de restos, tales como restos de aminoácidos, cuya secuencia forma un subconjunto de una secuencia más grande. Por ejemplo, si un polipéptido fuera sometido a tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas comunes, tales como tripsina o quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarían partes, segmentos o fragmentos del polipéptido de partida. Cuando se usa en relación con polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos mediante el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "porcentaje de identidad" o "porcentaje idéntica", cuando se hace referencia a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de la alineación de la secuencia que se va a comparar (la "Secuencia comparada") con la secuencia descrita o reivindicada (la "Secuencia de referencia"). El porcentaje de identidad se determina entonces de acuerdo con la siguiente fórmula: porcentaje de identidad = $100 [1 - (C/R)]$

en donde C es el número de diferencias entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada a lo largo de la longitud de alineación entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada, en donde

- (i) cada base o aminoácido en la Secuencia de Referencia que no tiene una base o aminoácido alineado correspondiente en la Secuencia Comparada y
- (ii) cada hueco en la Secuencia de Referencia y
- (iii) cada base o aminoácido alineado en la Secuencia de Referencia que es diferente de una base o aminoácido alineado en la Secuencia Comparada, constituye una diferencia y
- (iiii) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es el número de bases o aminoácidos en la Secuencia de Referencia a lo largo de la longitud de la alineación con la Secuencia Comparada, contándose también cualquier hueco creado en la Secuencia de Referencia como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la Secuencia comparada y la Secuencia de referencia para la cual el porcentaje de identidad calculado anteriormente es aproximadamente igual o mayor que un Porcentaje de identidad mínimo especificado, entonces la Secuencia comparada tiene el porcentaje mínimo de identidad especificado con la Secuencia de referencia, aunque las alineaciones puedan existir en los cuales el porcentaje de identidad calculado anteriormente en el presente documento es menor que el porcentaje de identidad especificado.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación proporciona por lo tanto un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54. Los péptidos de la presente divulgación tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o versiones alargadas de dichos péptidos de clase II.

En la presente divulgación, el término "homólogo" se refiere al grado de identidad (véase el porcentaje de identidad anteriormente) entre secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias peptídicas o polipeptídicas. La "homología" mencionada anteriormente se determina comparando dos secuencias alineadas en condiciones óptimas sobre las secuencias que van a compararse. Dicha homología de secuencia puede calcularse creando una alineación usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW. Los software de análisis de secuencia comúnmente disponibles, más específicamente, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas se proporcionan por bases de datos públicas.

Un experto en la materia podrá evaluar, si los linfocitos T inducidos por una variante de un péptido específico podrán reaccionar de forma cruzada con el propio péptido (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Por una "variante" de la secuencia de aminoácidos dada los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los restos de aminoácidos se alteran (por ejemplo reemplazándolos por la cadena lateral de otro resto de aminoácido de origen natural o alguna otra cadena lateral) de tal manera que el péptido todavía es capaz de unirse a una molécula de HLA sustancialmente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54. Por ejemplo, un péptido puede modificarse para que al menos mantenga, si no mejora, la capacidad de interactuar y unirse al surco de unión de una molécula MHC adecuada, tal como HLA-A*02 o -DR, y de esa manera al menos mantiene, si no mejora, la capacidad de unirse al TCR de los linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden posteriormente reaccionar de forma cruzada con células y destruir células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín como se define en los aspectos de la invención. Como se desprende de la bibliografía científica y de las bases de datos (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente restos de anclaje que forman una secuencia central que se adapta al motivo de unión del receptor de HLA, que se define por propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen el surco de unión. Por lo tanto, un experto en la materia sería capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO 54, manteniendo los restos de anclaje conocidos, y sería capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unirse a moléculas de MHC de clase I o II. Las variantes de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54 conservan la capacidad de unirse al TCR de las células T activadas, que posteriormente puede reaccionar de forma cruzada y destruir células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín como se define en los aspectos de la divulgación.

Los péptidos originales (no modificados) como se desvelan en el presente documento pueden modificarse mediante la sustitución de uno o más restos en diferentes, posiblemente selectivos, sitios dentro de la cadena peptídica, si no se dice de otra manera. Preferentemente esas sustituciones están situadas al final de la cadena de aminoácidos. Tales sustituciones pueden ser de naturaleza conservativa, por ejemplo, donde un aminoácido se reemplaza por un aminoácido de estructura y características similares, tal como cuando un aminoácido hidrófobo se reemplaza por otro aminoácido hidrófobo. Aún más conservativo sería el reemplazo de aminoácidos del mismo o similar tamaño y naturaleza química, como cuando la leucina se reemplaza por isoleucina. En estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras y, a menudo, muestran correlación con similitudes en tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, y tal es la base para definir "sustituciones conservativas".

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

Las sustituciones menos conservativas podrían implicar la sustitución de un aminoácido por otro que tenga características similares pero que sea algo diferente en tamaño, tal como la sustitución de una alanina por un resto de isoleucina. Los reemplazos altamente no conservativos podrían implicar la sustitución de un aminoácido ácido por uno que sea polar, o incluso por uno que sea de carácter básico. Estas sustituciones "radicales" no pueden, sin embargo, descartarse como potencialmente ineficaces, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien podrían dar lugar a efectos fortuitos que de otro modo no serían predecibles a partir de principios químicos simples.

Por supuesto, tales sustituciones pueden implicar estructuras distintas de los L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, los D-aminoácidos podrían sustituir a los L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en los péptidos antigénicos de la divulgación y aun así estar abarcados por la descripción en el presente documento. Además, también pueden usarse aminoácidos no estándar (es decir, distintos de los aminoácidos proteinógenos naturales comunes) con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos como se desvelan en el presente documento.

Si se descubre que las sustituciones en más de una posición dan como resultado un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor como se define a continuación, después se probarán combinaciones de esas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas dan como resultado efectos aditivos o sinérgicos sobre la antigenicidad del péptido. A lo sumo, no se sustituirían simultáneamente más de 4 posiciones dentro del péptido.

Un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en el presente documento puede tener uno o dos aminoácidos que no son de anclaje (véase más adelante con respecto al motivo de anclaje) intercambiados sin que tenga la capacidad de unirse a una molécula de la clase del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano -I o -II se modifica sustancialmente o se ve afectado negativamente, en comparación con el péptido no modificado. En otra realización, en un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en el presente documento, uno o dos aminoácidos pueden intercambiarse con sus compañeros de intercambio conservadores (véase más adelante en el presente documento) sin que la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II cambie sustancialmente o se vea afectada negativamente, en comparación con el péptido no modificado.

Los restos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor de linfocitos T pueden modificarse mediante reemplazo con otros aminoácidos cuya incorporación no afecta sustancialmente la reactividad de los linfocitos T y no elimina la unión al MHC relevante. Por lo tanto, aparte de la condición dada, el péptido de la divulgación puede ser cualquier péptido (término mediante el cual los inventores incluyen oligopéptido o polipéptido), que incluye las secuencias de aminoácidos o una porción o variante de las mismas tal como se proporciona.

ES 3 005 964 T3

Tabla 2: Variantes y motivo de los péptidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1, 3 y 9

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1	K	L	L	D	N	L	H	D	L
Variante									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 3	G	L	D	G	A	T	Y	T	V
Variante									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I

ES 3 005 964 T3

(continuación)

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 9	S	L	Y	P	G	T	E	T	M
Variante									V
									I
									L
									A
		M							V
		M							I
		M							L
		M							A
		A							V
		A							I
		A							L
		A							A
		V							V
		V							I
		V							L
		V							A
		T							V
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							V

(continuación)

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Q							I
		Q							L
		Q							A

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). Es posible que los epítomos del MHC de clase I, aunque normalmente entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, se generan mediante el procesamiento de péptidos a partir de péptidos o proteínas más largos que incluyen el epítomo real. Se prefiere que los restos que flanquean el epítomo real sean restos que no afecten sustancialmente a la escisión proteolítica necesaria para exponer el epítomo real durante el procesamiento.

Los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54 pueden alargarse en hasta cuatro aminoácidos, es decir, pueden añadirse 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a cualquiera de los extremos en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. Las combinaciones de los alargamientos pueden encontrarse en la Tabla 7.

Tabla 3: Combinaciones de alargamientos de péptidos

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

Los aminoácidos para el alargamiento/la extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido. El alargamiento puede usarse para mejorar la estabilidad o la solubilidad de los péptidos.

Por lo tanto, los epítomos desvelados en el presente documento pueden ser idénticos a epítomos asociados a tumores o específicos de tumores de origen natural o pueden incluir epítomos que difieren en no más de cuatro restos del péptido de referencia, siempre que tengan actividad antigénica sustancialmente idéntica.

Por supuesto, el péptido o variante desvelado en el presente documento tendrá la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II. La unión de un péptido o una variante a un complejo del MHC puede probarse mediante métodos conocidos en la técnica.

Preferentemente, cuando las células T específicas para un péptido se prueban contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la que los péptidos sustituidos alcanzan la mitad del aumento máximo en la lisis con respecto al fondo no es más de aproximadamente 1 mM, preferentemente no más de aproximadamente 1 μ M, más preferentemente no más de aproximadamente 1 nM y aún más preferentemente no más de aproximadamente 100 pM, y lo más preferentemente no más de aproximadamente 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por linfocitos T de más de un individuo, al menos dos, y más preferentemente tres individuos.

En un ejemplo, el péptido consiste o consiste prácticamente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54.

"Consistente esencialmente en" significará que un péptido, además de la secuencia de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54 o una variante de la misma contiene tramos adicionales de aminoácidos ubicados en el extremo N y/o C que no necesariamente forman parte del péptido que funciona como un epítomo para el epítomo de

moléculas MHC.

Sin embargo, estos tramos pueden ser importantes para proporcionar una introducción eficiente del péptido en las células. En un ejemplo, el péptido es parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") como derivan del NCBI, Número de registro de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos desvelados en el presente documento pueden fusionarse a un anticuerpo como se describe en el presente documento, o una parte funcional del mismo, en particular en una secuencia de un anticuerpo, para marcarse como diana específicamente por dicho anticuerpo, o, por ejemplo, hacia o dentro de un anticuerpo que es específico para células dendríticas como se describe en el presente documento.

Además, el péptido o la variante pueden modificarse aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a moléculas de MHC para provocar una respuesta inmunitaria más fuerte. Los métodos para dicha optimización de una secuencia peptídica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos.

En un enlace peptídico inverso los restos de aminoácidos no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) pero el enlace peptídico está invertido. Tales peptidomiméticos retroinversos pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como aquellos descritos en Meziere et al (1997) (Meziere *et al.*, 1997). Esta estrategia implica preparar pseudopéptidos que contienen cambios que implican la cadena principal y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere *et al.* (Meziere *et al.*, 1997) muestran que para la unión del MHC y las respuestas de los linfocitos T colaboradores, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Un enlace no peptídico es, por ejemplo, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. El documento US 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implican polipéptidos sintetizados mediante procedimientos convencionales y el enlace no peptídico sintetizado mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH₃.

Los péptidos que comprenden las secuencias descritas anteriormente pueden sintetizarse con grupos químicos adicionales presentes en sus extremos amino y/o carboxi, para potenciar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, pueden añadirse grupos hidrófobos tales como grupos carbobenzoxilo, dansilo o t-butiloxycarbonilo a los extremos amino de los péptidos. Igualmente, puede colocarse un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo en los extremos amino de los péptidos. Adicionalmente, el grupo hidrófobo, t-butiloxycarbonilo o un grupo amido puede añadirse a los extremos carboxi de los péptidos.

El péptido de la invención puede sintetizarse para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede usarse el isómero D de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido, en lugar del habitual isómero L. Aún además, al menos uno de los restos de aminoácidos de los péptidos de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54 pueden sustituirse por uno de los residuos de aminoácidos no naturales bien conocidos. 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 forma similar, un péptido de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a 11 y 13 a 54 pueden modificarse químicamente haciendo reaccionar aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Los ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y se resumen, por ejemplo, en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3ª ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004). La modificación química de aminoácidos incluye pero no se limita a, modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), modificación amida de grupos carboxilo y modificación sulfhidrilo mediante oxidación con ácido per fórmico de cisteína a ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tior, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a los mismos. A este respecto, se remite al experto al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) para una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

Resumiendo, la modificación de, por ejemplo, los restos de arginilo en las proteínas a menudo se basan en la reacción de compuestos de dicarbonilo vecinales tales como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con restos de arginina. La cisteína puede modificarse sin modificación concomitante de otros sitios nucleofílicos tales como la lisina y la histidina. Como resultado, hay una gran cantidad de reactivos disponibles para la modificación de cisteína. Los sitios web de empresas como Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) proporcionan información sobre reactivos específicos.

También es común la reducción selectiva de los enlaces disulfuro en las proteínas. Los enlaces disulfuro pueden formarse y oxidarse durante el tratamiento térmico de productos biofarmacéuticos. El reactivo K de Woodward puede usarse para modificar restos de ácido glutámico específicos. La N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida puede

usarse para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un resto de lisina y un resto de ácido glutámico. Por ejemplo, el pirocarbonato de dietilo es un reactivo para la modificación de restos de histidilo en proteínas. La histidina también puede modificarse usando 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los restos de lisina y otros grupos α -amino es, por ejemplo, útil en la unión de péptidos a superficies o en la reticulación de proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de unión del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glicosilación de proteínas. Los restos de metionina en las proteínas pueden modificarse, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

Pueden usarse tetranitrometano y N-acetilimidazol para la modificación de restos de tirosilo. La reticulación mediante la formación de ditirosina puede lograrse con iones de peróxido de hidrógeno/cobre.

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

La modificación exitosa de proteínas y péptidos terapéuticos con PEG a menudo se asocia a una extensión de la semivida circulatoria mientras se reticulan las proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se usan para la preparación de hidrogeles. La modificación química de los alérgenos para inmunoterapia a menudo se logra mediante carbamilación con cianato de potasio.

Se desvela también un péptido, en donde el péptido está modificado o incluye enlaces no peptídicos.

Otra realización de la presente invención se refiere al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma, que se ha producido sintéticamente (por ejemplo, sintetizado) como una sal farmacéuticamente aceptable. Los métodos para producir péptidos sintéticamente son bien conocidos en la técnica. Las sales de los péptidos de acuerdo con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, ya que los péptidos tal y como se generan *in vivo* no son sales. La forma salina no natural del péptido media la solubilidad del péptido, en particular en el contexto de composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos, por ejemplo, las vacunas peptídicas como se desvelan en el presente documento. Se requiere una solubilidad suficiente y al menos sustancial del péptido o péptidos con el fin de proporcionar eficazmente los péptidos al sujeto a tratar. Preferentemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos. Estas sales de acuerdo con la invención comprenden sales alcalinas y alcalinotérreas tales como sales de la serie de Hofmeister que comprenden como aniones PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- y como cationes NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Ba^{2+} . Particularmente las sales se seleccionan de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , $\text{Rb}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 y $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Se prefieren particularmente acetato de NH, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl y CaCl_2 , tales como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato).

Generalmente, los péptidos y las variantes (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre restos de aminoácidos) pueden sintetizarse mediante el modo Fmoc-poliámidas de síntesis de péptidos en fase sólida como lo describe Lukas et al. (Lukas et al., 1981) y por las referencias citadas allí. La protección temporal del grupo N-amino la proporciona el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetitiva de este grupo protector altamente lábil en bases se realiza usando 20 % de piperidina en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de las cadenas laterales pueden protegerse como sus éteres butílicos (en el caso de serina treonina y tirosina), ésteres butílicos (en el caso del ácido glutámico y del ácido aspártico), derivado de butiloxycarbonilo (en el caso de lisina e histidina), derivado tritilo (en el caso de la cisteína) y derivado 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). Cuando la glutamina o la asparagina son restos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibencidrilo para la protección de las funcionalidades amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero principal), bisacriloletilendiamina (reticulante) y éster metílico de acrilolsarcosina (agente funcionalizante). El agente enlazado escindible de péptido a resina usado es el derivado del ácido 4-hidroxiacetilfenoxiacético lábil al ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden como sus derivados de anhídrido simétricos preformados con excepción de la asparagina y la glutamina, que se suman usando un procedimiento de acoplamiento invertido mediado por N,N-diciclohexil-carbodiimida/1hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan usando procedimientos de prueba de ninhidrina, de ácido trinitrobencenosulfónico o de isotina. Tras completarse la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de resina con la eliminación concomitante de los grupos protectores de las cadenas laterales mediante tratamiento con ácido trifluoroacético al 95 % que contiene una mezcla eliminadora del 50 %. Los eliminadores comúnmente usados incluyen etanoditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo la elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se sintetiza. También es posible una combinación de metodologías en fase sólida y en fase solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, (Bruckdorfer et al.,

2004), y las referencias allí citadas).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación al vacío, con trituración posterior con éter dietílico proporcionando el péptido bruto. Cualquier eliminador presente se elimina mediante un procedimiento de extracción simple que, tras la liofilización de la fase acuosa, proporciona el péptido bruto libre de eliminadores. Los reactivos para la síntesis de péptidos generalmente están disponibles, por ejemplo, en Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

La purificación puede ser realizada por cualquiera, o una combinación de, técnicas tales como recristalización, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y (normalmente) cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando, por ejemplo, separación en gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de péptidos puede llevarse a cabo usando cromatografía en capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, análisis de aminoácidos después de la hidrólisis ácida y mediante análisis espectrométrico de masas por bombardeo atómico rápido (FAB), así como análisis espectrométrico de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

Para seleccionar péptidos sobrerepresentados, se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación replicada. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con una línea base de muestras de tejido normal. Cada uno de estos perfiles puede consolidarse después en una puntuación de sobrerepresentación calculando el valor de p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015) ajustando las pruebas múltiples por la tasa de descubrimiento falso (Benjamini y Hochberg, 1995) (véase el Ejemplo 1, la Figura 1).

Para la identificación y la cuantificación relativa de ligandos HLA mediante espectrometría de masas, se purificaron moléculas de HLA de muestras de tejido congeladas por choque y se aislaron péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y las secuencias se identificaron mediante experimentos en línea de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) con ionización por nanoelectropulverización (nanoESI). Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los péptidos naturales asociados a tumores (TUMAP) registrados a partir de muestras de cáncer uterino (N = 15 muestras A*02 positivas) con los patrones de fragmentación de los correspondientes péptidos sintéticos de referencia de secuencias idénticas. Dado que los péptidos fueron identificados directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados aportan pruebas directas del procesamiento natural y la presentación de los péptidos identificados en tejido canceroso primario obtenido de 15 pacientes con cáncer uterino.

El proceso de descubrimiento XPRESIDENT® v2.1 (véase, por ejemplo, el documento US 2013-0096016) permite la identificación y la selección de candidatos a vacunas peptídicas sobrerepresentadas relevantes basándose en la cuantificación relativa directa de los niveles de péptidos restringidos por HLA en tejidos cancerosos en comparación con diversos tejidos y órganos no cancerosos diferentes. Esto se logró mediante el desarrollo de una cuantificación diferencial sin marcadores usando los datos de CL-EM adquiridos procesados por un proceso de análisis de datos patentado, combinando algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento espectral, recuento de iones, alineación del tiempo de retención, estado de carga desconvolución y normalización.

Se establecieron niveles de presentación que incluyen estimaciones de error para cada péptido y muestra. Se han identificado péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y péptidos sobrerepresentados en tejidos y órganos tumorales frente a tejidos y órganos no cancerosos.

Se purificaron los complejos HLA-péptido a partir de muestras de tejido de cáncer uterino y se aislaron los péptidos asociados a HLA que se analizaron mediante CL-EM (véanse los ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud fueron identificados con este enfoque en muestras de cáncer uterino primario confirmando su presentación en cáncer uterino primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos normales y de cáncer uterino se cuantificaron mediante recuento iónico de datos CL-EM sin marcador. El método asume que las áreas de señal CL-EM de un péptido se correlacionan con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas de un péptido en diversos experimentos de CL-EM se normalizaron basándose en la tendencia central, promediado por muestra y fusionado en un diagrama de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación consolida diferentes métodos de análisis como búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupamiento espectral, desconvolución del estado de carga (descarga) y alineación y normalización del tiempo de retención.

Además de la sobrerepresentación del péptido, se comprobó la expresión de ARNm del gen subyacente. Los datos de ARNm se obtuvieron mediante análisis RNASeq de tejidos normales y tejidos cancerosos (véase el Ejemplo 2, la Figura 2). Una fuente adicional de datos de tejido normal fue una base de datos de expresión de ARN disponible públicamente de alrededor de 3000 muestras de tejido normal (Lonsdale, 2013). Los péptidos que derivan de proteínas cuyo ARNm codificante está altamente expresado en el tejido canceroso, pero muy bajo o ausente en tejidos vitales normales, se incluyeron preferentemente en la presente divulgación.

Se desvelan en el presente documento péptidos útiles en el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente cáncer de útero que sobrerepresente o presente exclusivamente los péptidos de la divulgación. Se demostró por espectrometría de masas que estos péptidos están presentes de forma natural en las moléculas HLA de muestras primarias de cáncer uterino humano.

Se ha demostrado que muchos de los genes/proteínas fuente (también denominados "proteínas completas" o "proteínas subyacentes") de los que derivan los péptidos están altamente sobreexpresados en el cáncer en comparación con los tejidos normales; por "tejidos normales", como se utiliza en el presente documento, se entenderá las células sanas del útero u otras células de tejidos normales, demostrando un alto grado de asociación tumoral de los genes fuente (véase el Ejemplo 2). Por otra parte, los propios péptidos están fuertemente sobrerepresentados en el tejido tumoral - por "tejido tumoral", como se utiliza en el presente documento, se entenderá una muestra de una paciente que padezca cáncer de útero, pero no en tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo, células de cáncer uterino que presentan los péptidos derivados.

Se ha demostrado que los péptidos desvelados en el presente documento son capaces de estimular respuestas de linfocitos T y/o está sobrerepresentado y, por lo tanto, puede usarse para la producción de anticuerpos y/o TCR, tales como los TCR solubles (véanse el Ejemplo 3, el Ejemplo 4). Adicionalmente, los péptidos cuando forman complejos con el MHC respectivo pueden usarse para la producción de anticuerpos y/o TCR, en particular también los sTCR. Los métodos respectivos son bien conocidos por el experto y también pueden encontrarse en la bibliografía respectiva. Por lo tanto, los péptidos desvelados en el presente documento son útiles para generar una respuesta inmunitaria en un paciente mediante la cual pueden destruirse células tumorales. Puede inducirse una respuesta inmunitaria en un paciente mediante la administración directa de los péptidos descritos o sustancias precursoras adecuadas (por ejemplo, péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifican estos péptidos) al paciente, idealmente en combinación con un agente que mejore la inmunogenicidad (es decir, un adyuvante). Puede esperarse que la respuesta inmunitaria que se origina a partir de dicha vacunación terapéutica sea altamente específica contra las células tumorales porque los péptidos diana desvelados en el presente documento no se presentan en tejidos normales en números de copias comparables, evitando el riesgo de reacciones autoinmunitarias no deseadas contra las células normales del paciente.

La presente descripción se refiere además a receptores de linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta ("TCR alfa/beta"). También se proporcionan péptidos capaces de unirse a TCR y anticuerpos cuando se presentan mediante una molécula de MHC. La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para expresar TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos de uso de los mismos.

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

En una realización la descripción proporciona un método para producir un TCR como se describe en el presente documento, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora capaz de expresar el TCR en condiciones adecuadas para promover la expresión del TCR.

La descripción en otro aspecto se refiere a métodos de acuerdo con la descripción, en donde el antígeno se carga sobre moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada o de una célula presentadora de antígenos artificial poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígenos o el antígeno se carga sobre tetrámeros de MHC de clase I o II tetramerizando los monómeros del complejo antígeno/MHC de clase I o II.

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

Con respecto a los TCR gamma/delta, la expresión "dominio variable gamma TCR" como se usa en el presente documento se refiere a la concatenación de la región gamma V (TRGV) de TCR sin región líder (L), y la región gamma J (TRGJ) de TCR, y el término dominio constante gamma TCR se refiere a la región TRGC extracelular, o a una secuencia TRGC truncada C-terminal. Asimismo, la expresión "dominio variable delta de TCR" se refiere a la concatenación de la región delta V de TCR (TRDV) sin región líder (L) y la región D/J delta de TCR (TRDD/TRDJ), y la expresión "dominio constante delta de TCR" se refiere a la región TRDC extracelular, o a una secuencia TRDC

truncada C-terminal.

Los TCR de la presente descripción se unen preferentemente a un complejo de péptido-molécula HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos o aproximadamente 10 μ M o menos. Se prefieren más los TCR de alta afinidad que tienen afinidades de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Los ejemplos no limitantes de intervalos de afinidad de unión preferidos para los TCR de la presente divulgación incluyen de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM; de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM; de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM; de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM; de aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM; de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM; de aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM; de aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM; de aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM; y aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM.

Como se usa en el presente documento en relación con los TCR de la presente descripción, "unión específica" y variantes gramaticales de la misma se usan para referirse a un TCR que tiene una afinidad de unión (KD) por un complejo péptido-molécula HLA de 100 μ M o menos.

Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener un enlace disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen aquellos que tienen una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 excepto que Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 se reemplazan por restos de cisteína, dichas cisteínas forman un enlace disulfuro entre la secuencia del dominio constante TRAC y la secuencia del dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

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

Los TCR de la presente descripción pueden comprender un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los TCR de la presente descripción pueden conjugarse con un agente terapéuticamente activo, tal como un radionucleido, un agente quimioterapéutico o una toxina.

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

En una realización, un TCR que comprende al menos una mutación en la cadena alfa de TCR y/o la cadena beta de TCR tiene una afinidad de unión por y/o una semivida de unión por, un complejo péptido-molécula HLA, que es al menos el doble que el de un TCR que comprende la cadena alfa de TCR no mutada y/o la cadena beta de TCR no mutada. La mejora de la afinidad de TCR específicos de tumores y su explotación, se basa en la existencia de una ventana para afinidades óptimas de TCR. La existencia de dicha ventana se basa en observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos por HLA-A2 tienen valores de KD que generalmente son aproximadamente 10 veces más bajos en comparación con los TCR específicos para autoantígenos asociados a tumores restringidos por HLA-A2. Ahora se sabe, aunque los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, debido a que los tumores surgen de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento de traducción alterado serán consideradas extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados positivamente o sobreexpresados (los llamados autoantígenos) no necesariamente inducirán una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor. Los linfocitos T que expresan TCR que son altamente reactivos a estos antígenos habrán sido seleccionados negativamente dentro del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solo quedan linfocitos T con TCR de baja afinidad por los autoantígenos. Por lo tanto, la afinidad de los TCR o variantes de la presente descripción por los péptidos puede mejorarse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente descripción, comprendiendo dicho método la incubación de PBMC de donantes sanos HLA-A*02 negativos con monómeros A2/péptido, incubar las PBMC con tetrámero-ficoeritrina (PE) y aislar los linfocitos T de alta avidéz mediante análisis de Calibur de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente descripción, comprendiendo dicho método obtener un ratón transgénico con todos los loci del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyas linfocitos T expresan un repertorio diverso de TCR humano que compensa la deficiencia de TCR de ratón, inmunizar al ratón con un péptido, incubar PBMC obtenidas de ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE) y aislar los linfocitos T de alta avidéz mediante análisis de Calibur de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

En un aspecto, para obtener linfocitos T que expresan TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción se clonan en vectores de expresión, tales como el retrovirus gamma o el lentivirus. Los virus recombinantes se generan y después se prueba su funcionalidad, tales como la especificidad antigénica y la avidéz funcional. Después se usa una alícuota del producto final para transducir la población de linfocitos T diana (generalmente purificadas a partir de PBMC del paciente), que se expande antes de la infusión en el paciente.

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

Para aumentar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican TCR de la presente descripción pueden estar unidos operativamente a promotores fuertes, tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas, citomegalovirus (CMV), virus de células madre murinas (MSCV) U3, fosfoglicerato quinasa (PGK), β -actina, ubiquitina y un promotor compuesto del virus simio 40 (SV40)/CD43, factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus formador de focos del bazo (SFFV). En una realización preferida, el promotor es heterólogo con respecto al ácido nucleico que se expresa.

Además de promotores fuertes, los casetes de expresión de TCR de la presente descripción pueden contener elementos adicionales que pueden mejorar la expresión transgénica, incluyendo un tracto central de polipurina (cPPT), que promueve la translocación nuclear de construcciones lentivíricas (Follenzi *et al.*, 2000), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (wPRE), que aumenta el nivel de expresión transgénica al aumentar la estabilidad del ARN (Zufferey *et al.*, 1999).

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

Lograr una expresión superficial de TCR de alto nivel requiere que tanto las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido se transcriban en niveles altos. Para ello, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción pueden clonarse en construcciones bicistrónicas en un único vector, que ha demostrado ser capaz de superar este obstáculo. El uso de un sitio vírico de entrada intrarribosómica (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da como resultado la expresión coordinada de ambas cadenas, debido a que las cadenas TCR-alfa y TCR-beta se generan a partir de una única transcripción que se divide en dos proteínas durante la traducción, garantizando que se produzca una proporción molar igual de cadenas TCR-alfa y TCR-beta (Schmitt *et al.*, 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden optimizarse con codones para aumentar la expresión de una célula hospedadora. La redundancia en el código genético permite que algunos aminoácidos estén codificados por más de un codón, pero determinados codones son menos "óptimos" que otros debido a la relativa disponibilidad de ARNt coincidentes así como a otros factores (Gustafsson *et al.*, 2004). Modificar las secuencias de los genes TCR-alfa y TCR-beta de tal manera que cada aminoácido esté codificado por el codón óptimo para la expresión de genes de mamíferos, además de eliminar motivos de inestabilidad de ARNm o sitios de corte y empalme crípticos, se ha demostrado que mejora significativamente la expresión de los genes TCR-alfa y TCR-beta (Scholten *et al.*, 2006).

Adicionalmente, el emparejamiento incorrecto entre las cadenas de TCR introducidas y endógenas puede dar lugar a la adquisición de especificidades que suponen un riesgo significativo para la autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros de TCR mixtos puede reducir el número de moléculas de CD3 disponibles para formar complejos de TCR emparejados adecuadamente y, por lo tanto, puede disminuir significativamente la avidéz funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball *et al.*, 2007).

Para reducir el emparejamiento incorrecto, el dominio C-terminal de las cadenas de TCR introducidas de la presente descripción puede modificarse para promover la afinidad entre cadenas, mientras disminuye la capacidad de las cadenas introducidas para emparejarse con el TCR endógeno. Estas estrategias pueden incluir la sustitución de los dominios C-terminales TCR-alfa y TCR-beta humanos con sus homólogos murinos (dominio C-terminal murinizado); generando un segundo enlace disulfuro entre cadenas en el dominio C-terminal introduciendo un segundo resto de cisteína en las cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducido (modificación de cisteína); intercambiando restos que interactúan en los dominios del extremo C de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta ("perilla en el agujero"); y fusionando los dominios variables de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta directamente a CD3 ζ (fusión CD3 ζ) (Schmitt *et al.*, 2009).

En una realización, se diseña una célula hospedadora para expresar un TCR de la presente descripción. En realizaciones preferidas, la célula hospedadora es un linfocito T humano o un linfocito T progenitor. En algunas realizaciones el linfocito T o el progenitor de linfocito T se obtiene de un paciente con cáncer. En otras realizaciones el linfocito T o el progenitor de linfocito T se obtiene de un donante sano. Las células hospedadoras de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto a un paciente a tratar. En una realización, el hospedador

es un linfocito T gamma/delta transformado para expresar un TCR alfa/beta.

Una "composición farmacéutica" es una composición adecuada para su administración a un ser humano en un entorno médico. Preferentemente, una composición farmacéutica es estéril y se produce según las directrices GMP.

Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también anteriormente). Como se usa en el presente documento, "una sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los péptidos desvelados en donde el péptido se modifica preparando sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente en donde la forma neutra del fármaco tiene un grupo -NH₂ neutro) que implica una reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar 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-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas de restos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se prepara usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, hidróxido cálcico, trimetilamina o similares.

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

Preferentemente, el medicamento de la presente divulgación es un inmunoterapéutico tal como una vacuna. Pueden administrarse directamente en el paciente, en el órgano afectado o sistémicamente 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 posteriormente se administran al paciente o se usan *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, que después se vuelven a administrar al paciente. Si el ácido nucleico se administra a las células *in vitro*, puede ser útil que las células que se van a transfectar coexpresen citocinas inmunoestimulantes, tales como interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulante (véase a continuación) o usarse en combinación con citocinas inmunoestimulantes, o administrarse con un sistema de administración adecuado, por ejemplo liposomas. El péptido también puede conjugarse con un vehículo adecuado tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o manano (véase el documento WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido también puede estar etiquetado, puede ser una proteína de fusión o puede ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se proporciona en la presente divulgación estimulen los linfocitos T CD4 o CD8. Sin embargo, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente en presencia de la ayuda proporcionada por los linfocitos T auxiliares CD4. Por lo tanto, para epítomos de MHC Clase I que estimulan linfocitos T CD8 el compañero de fusión o secciones de una molécula híbrida proporcionan adecuadamente epítomos que estimulan linfocitos T CD4 positivos. Los epítomos estimulantes de CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en el presente documento.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida de SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 54 y al menos un péptido adicional, preferentemente de dos a 50, más preferentemente de dos a 25, incluso más preferentemente de dos a 20 y lo más preferentemente 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 pueden unirse a moléculas de MHC de clase I.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica el péptido de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, ya sean mono y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, polinucleótidos con una estructura principal de fosforotioato y puede contener o no intrones siempre que codifiquen el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contienen restos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales son codificables por un polinucleótido. Aun otro aspecto de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar el péptido de acuerdo con la invención.

Se han desarrollado una diversidad de métodos para enlazar polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo, a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, pueden añadirse tratos homopoliméricos complementarios al segmento de ADN que va a insertarse al ADN de vector. El vector y el segmento de ADN se unen después por un enlace de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinantes.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores. Los enlazadores sintéticos que contienen una diversidad de sitios de endonucleasas de restricción están disponibles en el mercado de una diversidad de fuentes incluyendo International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE.UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el péptido de la invención emplea la reacción en cadena de

la polimerasa como se ha descrito por Saiki RK, et al. (Saiki et al., 1988). Este método puede usarse para introducir ADN en un vector adecuado, por ejemplo, modificando por ingeniería genética en sitios adecuados para digestión con enzimas de restricción, o puede usarse para modificar el ADN de otra forma útil como se conoce en la técnica. Si se usan vectores víricos, se prefieren los vectores de viruela o adenovirus.

El ADN (o en el caso de vectores retrovíricos, el ARN) puede expresarse a continuación en un hospedador adecuado para producir el péptido de la invención. Por lo tanto, el ADN que codifica el péptido de la invención puede usarse de acuerdo con técnicas conocidas, debidamente modificado en vista de las enseñanzas contenidas en este documento, para construir un vector de expresión, que después se usa para transformar una célula hospedadora apropiada para la expresión y la producción del péptido de la invención. Tales técnicas incluyen aquellas desveladas, por ejemplo, en los documentos US 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 en el caso de vectores retrovíricos, el ARN) que codifica el péptido que constituye el compuesto de la invención puede unirse a una amplia diversidad de otras secuencias de ADN para su introducción en un hospedador apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, de la forma de introducción del ADN en el hospedador y si se desea el mantenimiento episómico o la integración.

Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en la orientación adecuada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede enlazarse a las secuencias de nucleótidos de control reguladoras de la transcripción y la traducción apropiadas reconocidas por el hospedador deseado, aunque dichos controles generalmente están disponibles en el vector de expresión. Después el vector se introduce en el hospedador a través de técnicas convencionales. Generalmente, no todos los hospedadores serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar células hospedadoras transformadas. Una técnica de selección implica incorporar al vector de expresión una secuencia de ADN, con los elementos de control necesarios, que codifica un rasgo seleccionable en la célula transformada, tal como la resistencia a antibióticos.

Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se usa para cotransformar la célula hospedadora deseada.

Las células hospedadoras que se han transformado por el ADN recombinante de la invención se cultivan después durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la materia en vista de las enseñanzas desveladas en el presente documento para permitir la expresión del polipéptido, que después puede recuperarse.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos. Preferentemente, el sistema puede ser células de mamífero tales como células CHO disponibles en la Colección de Biología Celular de la ATCC.

Un plásmido vector de células de mamífero típico para expresión constitutiva comprende el promotor de CMV o de SV40 con una cola poli A adecuada y un marcador de resistencia, tal como neomicina. Un ejemplo es pSVL disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de un vector de expresión inducible en mamíferos es pMSG, también disponible de Pharmacia. Los vectores plasmídicos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y generalmente están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levadura (YIp) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómeros de levadura (Ycp). Los vectores basados en promotores de CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan expresión transitoria o estable, expresión o secreción citoplasmática y etiquetado 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 proteínas recombinantes. Las fusiones con etiquetas dobles brindan flexibilidad en la detección.

La fuerte región reguladora del promotor del citomegalovirus humano (CMV) impulsa niveles de expresión de proteínas constitutivos de hasta 1 mg/l en células COS. Para líneas celulares menos potentes, los niveles de proteínas son normalmente ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación de SV40 dará como resultado altos niveles de replicación de ADN en células COS permisivas a la replicación de SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen de pMB1 (derivado de pBR322) para su replicación en células bacterianas, el gen de la β -lactamasa para la selección de resistencia a la ampicilina en bacterias, hGH poliA y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de preprotripsina (PPT) pueden dirigir la secreción de proteínas de fusión FLAG al medio de cultivo para su purificación usando anticuerpos ANTI-FLAG, resinas y placas. Otros vectores y sistemas de expresión son bien conocidos en la técnica para su uso con una diversidad de células hospedadoras.

También se ha desvelado un ejemplo donde dos o más péptidos o variantes peptídicas desvelados en el presente documento se codifican y, por lo tanto, se expresan en un orden sucesivo (similar a las construcciones de "perlas en un collar"). Al hacerlo, los péptidos o variantes peptídicas pueden estar unidos o fusionados entre sí mediante tramos de aminoácidos enlazadores, tales como por ejemplo LLLLLL, o pueden estar enlazados sin ningún péptido o péptidos

adicionales entre ellos. Estas construcciones también pueden usarse para la terapia del cáncer y pueden inducir respuestas inmunitarias que impliquen tanto al MHC I como al MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con una construcción de vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser células hospedadoras procarióticas preferidas en algunas circunstancias y normalmente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* 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 de ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen células de levadura, de insectos y de mamíferos, preferentemente células de vertebrados, tales como, por ejemplo de ratón, de rata, de mono o líneas celulares fibroblásticas y de colon humanas. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que generalmente están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, células de embrión de ratón suizo NIH NIH/3T3 disponibles en la ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles en la ATCC como CRL 1650 y células 293 que son células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que pueden transfectarse con vectores de expresión de baculovirus. Puede encontrarse una descripción general sobre la elección de células hospedadoras adecuadas para la expresión en, por ejemplo, el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Parte uno, Segunda Edición, ISBN 978-1-58829-262-9 y otra bibliografía conocida por el experto.

La transformación de las células hospedadoras apropiadas con una construcción de ADN de la presente invención se logra mediante métodos muy conocidos que dependen normalmente del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse, por ejemplo, Cohen *et al.* (Cohen *et al.*, 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman. *et al.* (Sherman *et al.*, 1986). También es útil el método de Beggs (Beggs, 1978). Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles para transfectar dichas células, por ejemplo, formulaciones de fosfato cálcico y DEAE-dextrano o liposomas, están disponibles de Stratagene Cloning Systems o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es muy conocida en la técnica para transformar célula de levadura, células bacterianas, células de insectos y células de vertebrados.

Las células transformadas exitosamente, es decir, células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas tales como la PCR. Alternativamente, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede detectarse usando anticuerpos.

Se apreciará que determinadas células hospedadoras de la invención son útiles en la preparación del péptido de la invención, por ejemplo, células bacterianas, de levadura y de insectos. Sin embargo, otras células hospedadoras pueden ser útiles en determinados métodos terapéuticos. Por ejemplo, las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, pueden usarse útilmente para expresar el péptido de la invención de tal manera que pueda cargarse en moléculas MHC apropiadas. Por lo tanto, 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 antígenos, en particular una célula dendrítica o una célula presentadora de antígenos. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. el 29 de abril de 2010, para tratar el HRPC metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para producir el péptido, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora y aislar el péptido de la célula hospedadora o su medio de cultivo.

En otra realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se usan en medicina. Por ejemplo, el péptido puede prepararse para inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.), inyección intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos de inyección de péptidos incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos de inyección de ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Pueden darse dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferentemente de 125 µg a 500 µg, de péptido o ADN y dependerá del péptido o ADN respectivo. Las dosis de este intervalo se usaron con éxito en ensayos anteriores (Walter *et al.*, 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro o estar contenido en un vector o sistema de suministro adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir dicho ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Una descripción general se proporciona, por ejemplo, por Teufel. *et al.* (Teufel *et al.*, 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero no se comprende completamente el modo de acción de estos vectores para inducir una respuesta inmunitaria. Los vectores y los sistemas de administración adecuados incluyen ADN y/o ARN vírico, tales como sistemas basados en adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, virus del herpes, virus adenoasociados o híbridos que

contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de administración no víricos incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos y son bien conocidos en la técnica del suministro de ADN. El suministro físico, tal como a través de una "pistola genética", también puede usarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítipo que estimula los linfocitos T para la CDR opuesta respectiva como se señaló anteriormente.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que mejoran o potencian de forma no específica la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8 positivos y linfocitos T auxiliares (TH) a un antígeno, y por lo tanto se considerarían útiles en el medicamento de la presente invención. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAXO, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos TLR5 derivados de flagelina, ligando 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, monofosforil lípido 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 vector PepTel®, micropartículas basadas en poli(lactida co-glicólido) [PLG] y dextrano, talactoferrina SRL172, Virosomas y otras Partículas similares a virus, YF-17D, trampa de VEGF, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila, que deriva de saponina, extractos de micobacterias e imitadores sintéticos de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados tales como Ribi's Detox, Quil o Superfos. Se prefieren adyuvantes tales como de Freund o GM-CSF. Anteriormente se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo, MF59) específicos para células dendríticas y su preparación (Allison y Krummel, 1995). También pueden usarse citocinas. Varias citocinas se han relacionado directamente con la influencia de la migración de células dendríticas a los tejidos linfoides (por ejemplo, TNF-), acelerando la maduración de las células dendríticas en células presentadoras de antígenos eficientes para los linfocitos T (por ejemplo, GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Pat. de EE.UU. N.º 5.849.589) y que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFNalfa, IFN-beta) (Gabrilovich *et al.*, 1996).

También se ha informado que los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG mejoran los efectos de los adyuvantes en el ámbito de las vacunas. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los oligonucleótidos CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de receptores tipo Toll (TLR), principalmente TLR9. La activación de TLR9 desencadenada por CpG mejora las respuestas humores y celulares específicas de antígenos a una amplia diversidad de antígenos, incluyendo antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares autólogas y conjugados de polisacáridos en vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Aún más importante mejora la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo que da como resultado una mayor activación de las células TH1 y una fuerte generación de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso en ausencia de la ayuda de los linfocitos T CD4. El sesgo de TH1 inducido por la estimulación de TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacunas tales como alumbre o adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo de TH2. Los oligonucleótidos CpG muestran una actividad adyuvante aún mayor cuando se formulan o se coadministran con otros adyuvantes o en formulaciones tales como micropartículas, nanopartículas, emulsiones lipídicas o formulaciones similares, que son especialmente necesarios para inducir una respuesta fuerte cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígenos en aproximadamente dos órdenes de magnitud, con respuestas de anticuerpos comparables a la vacuna de dosis completa sin CpG en algunos experimentos (Krieg, 2006). El documento US 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos CpG, adyuvantes no de ácido nucleico y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un antagonista de CpG TLR9 es dSLIM (inmunomodulador de doble vástago) de Mologen (Berlín, Alemania), que es un componente preferido de la composición farmacéutica. Otras moléculas de unión a TLR tales como la unión de ARN a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9 también pueden usarse.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, pero no se limitan a CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), análogos de ARNbc como Poli(I:C) y derivados del mismo (por ejemplo, AmpliGen®, Hiltanol®, poli(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ADN o ARN bacteriano no CpG, así como pequeñas moléculas inmunoactivas y anticuerpos tales como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, Trampa de VEGF, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos dirigidos a estructuras clave del sistema inmunitario (por ejemplo, anti-CD40, anti-TGFbeta, receptor anti-TNFalfa) y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvante. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la materia sin experimentación excesiva.

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

En un ejemplo de la composición farmacéutica, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en factores estimulantes de colonias, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón alfa.

En un ejemplo de composición farmacéutica el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en factores estimulantes de colonias, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En un ejemplo adicional de composición farmacéutica el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes aún más preferidos son Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y mAB anti-CD40 o combinaciones de los mismos.

Esta composición se usa para administración parenteral, tal como administración subcutánea, intradérmica, intramuscular u oral. Para esto, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo medio farmacéuticamente aceptable, preferentemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, agentes aglutinantes, agentes explosivos, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias inmunoestimulantes, tales como citocinas. Una lista extensa de excipientes que pueden usarse en una composición tal, pueden tomarse, por ejemplo, de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). La composición puede usarse para una prevención, una profilaxis y/o una terapia de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones ilustrativas pueden encontrarse en, por ejemplo, EP2112253.

Es importante comprender que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna de acuerdo con la invención ataca al cáncer en diferentes estadios celulares y diferentes fases del desarrollo. Adicionalmente, se atacan diferentes rutas de señalización asociadas al cáncer. Esta es una ventaja sobre las vacunas que abordan solo una o pocas dianas, lo que puede hacer que el tumor se adapte fácilmente al ataque (escape del tumor). Adicionalmente, no todos los tumores individuales expresan el mismo patrón de antígenos. Por lo tanto, una combinación de varios péptidos asociados a tumores garantiza que cada tumor tenga al menos algunas de las dianas. La composición está diseñada de tal manera que se espera que cada tumor exprese varios de los antígenos y cubra varias rutas independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. Por lo tanto, la vacuna puede usarse fácilmente "disponible en el mercado" para una población de pacientes más amplia. Esto significa que una preselección de pacientes que serán tratados con la vacuna puede limitarse a la tipificación HLA, no requiere ninguna evaluación de biomarcadores adicionales para la expresión de antígenos, pero aun así se garantiza que varias dianas sean atacadas simultáneamente por la respuesta inmunitaria inducida, lo cual es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Como se usa en el presente documento, el término "andamio" se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (por ejemplo, antigénico). En una realización, un andamio es capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, un (segundo) resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico (por ejemplo, el complejo de un péptido con MHC, de acuerdo con la aplicación en cuestión). En otra realización un andamio es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno complejo receptor de linfocitos T. Los andamios incluyen, entre otros, anticuerpos y fragmentos de los mismos, fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprenden una región variable de la cadena pesada de anticuerpo y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo, proteínas de unión que comprenden al menos un motivo de repetición de anquirina y moléculas de unión a antígeno de dominio único (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) tales como linfocitos T alogénicos o autólogos. Para evaluar si una molécula es un andamio que se une a un diana, pueden realizarse ensayos de unión.

Unión "específica" significa que el andamio se une al complejo péptido-MHC de interés mejor que otros complejos péptido-MHC naturales, hasta el punto de que un armazón armado con una molécula activa que es capaz de destruir una célula que porta la diana específica no es capaz de destruir otra célula sin la diana específica pero que presenta otros complejos péptido-MHC. La unión a otros complejos péptido-MHC es irrelevante si el péptido del péptido con reacción cruzada-MHC no se produce de forma natural, es decir, no deriva del peptidoma HLA humano. Las pruebas para evaluar la destrucción de células diana son bien conocidas en la técnica. Deben realizarse usando células diana (células primarias o líneas celulares) con una presentación de péptido-MHC inalterada, o células cargadas con péptidos de tal manera que se alcancen los niveles de péptido-MHC naturales.

Cada armazón puede comprender un marcaje que proporciona que el armazón unido pueda detectarse determinando la presencia o la ausencia de una señal proporcionada por el marcador. Por ejemplo, el andamio puede marcarse con un tinte fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular aplicable. Estas moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un marcaje de fluorescencia, por ejemplo, proporcionado por un tinte fluorescente, puede proporcionar una visualización del aptámero unido mediante fluorescencia o microscopía de barrido láser o citometría de flujo.

Cada armazón puede conjugarse con una segunda molécula activa tal como, por ejemplo, IL-21, anti-CD3 y anti-CD28.

Para obtener más información sobre estructuras polipeptídicas véase, por ejemplo, la sección de antecedentes del documento WO 2014/071978A1 y las referencias citadas en el mismo.

Adicionalmente se desvelan aptámeros. Los aptámeros (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/191359 y la bibliografía citada en el mismo) son moléculas cortas de ácido nucleico monocatenario, que pueden plegarse en estructuras tridimensionales definidas y reconocer estructuras diana específicas. Han parecido ser alternativas adecuadas para desarrollar terapias dirigidas. Se ha demostrado que los aptámeros se unen selectivamente a una diversidad de dianas complejas con alta afinidad y especificidad.

En la última década se han identificado aptámeros que reconocen moléculas ubicadas en la superficie celular y proporcionan medios para desarrollar enfoques diagnósticos y terapéuticos. Dado que se ha demostrado que los aptámeros casi no poseen toxicidad ni inmunogenicidad, son candidatos prometedores para aplicaciones biomédicas. De hecho, los aptámeros, por ejemplo, aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, se han empleado con éxito para terapias dirigidas y se ha demostrado que son funcionales en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Adicionalmente, se han identificado aptámeros que reconocen líneas celulares tumorales específicas.

Los aptámeros de ADN pueden seleccionarse para revelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro para diversas células cancerosas y, particularmente, aquellas derivadas de tumores sólidos, mientras que no se reconocen las células no tumorigénicas y primarias sanas. Si los aptámeros identificados reconocen no solo un subtipo de tumor específico sino que interactúan con una serie de tumores, esto hace que los aptámeros sean aplicables como los llamados diagnósticos y terapéuticos de amplio espectro.

Además, la investigación del comportamiento de unión celular con citometría de flujo mostró que los aptámeros revelaron muy buenas afinidades aparentes que se encuentran dentro del intervalo nanomolar.

Los aptámeros son útiles con fines diagnósticos y terapéuticos. Además, pudo demostrarse que algunos de los aptámeros son absorbidos por las células tumorales y, por lo tanto, pueden funcionar como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes anticancerígenos tales como ARNip a las células tumorales.

Los aptámeros pueden seleccionarse frente a dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprenden, preferentemente que consiste en, una secuencia de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54, con la molécula MHC, usando la técnica cell-SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial).

El péptido de la presente invención puede usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden usarse para terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas al tejido enfermo. Otro uso de estos anticuerpos puede ser dirigir radionucleidos al tejido enfermo con fines de obtención de imágenes tales como PET. Este uso puede ayudar a detectar pequeñas metástasis o a determinar el tamaño y la localización precisa de los tejidos enfermos.

Por lo tanto, es un aspecto adicional de la invención proporcionar un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I que se compleja con un antígeno restringido por HLA, comprendiendo el método: inmunizar a un mamífero no humano modificado genéticamente que comprende células que expresan dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I con una forma soluble de una molécula de MHC de clase I que forma complejo con dicho antígeno restringido por HLA; aislar moléculas de ARNm de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producir una biblioteca de presentación en fagos que presenta moléculas de proteína codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislar al menos un fago de dicha biblioteca de presentación de fagos, uniéndose dicho al menos un fago que presenta dicho anticuerpo específicamente a dicho complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I que se compleja con dicho antígeno restringido por HLA.

Es un aspecto adicional de la invención proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I que forma complejo con el antígeno restringido por HLA, en donde el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

Los métodos respectivos para producir dichos anticuerpos y complejos mayores de histocompatibilidad de clase I de cadena sencilla, así como otras herramientas para la producción de estos anticuerpos se describen en el documento WO 03/068201, el documento WO 2004/084798, el documento WO 01/72768, el documento WO 03/070752 y en publicaciones (Cohen et al., 2003a; Cohen *et al.*, 2003b; Denkerberg *et al.*, 2003).

Preferentemente, el anticuerpo se une con una afinidad de unión por debajo de 20 nanomolar, preferentemente por debajo de 10 nanomolar, al complejo, que también se considera "específico" en el contexto de la presente invención.

Se desvela además un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a 11 y SEQ ID NO: 13 a 54 o una variante de la misma que sea al menos el 88 % homóloga (preferentemente idéntica) a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54.

Se desvelan adicionalmente los péptidos como se ha descrito que tienen la capacidad de unirse a una molécula del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II.

Se desvelan adicionalmente los péptidos como se ha descrito en donde el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54.

5 En el presente documento se desvelan además los péptidos como se ha desvelado, en donde el péptido está modificado (químicamente) y/o incluye enlaces no peptídicos.

10 Se desvelan además los péptidos como se ha desvelado, en donde el péptido es parte de una proteína de fusión, en particular que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (II), o en donde el péptido está fusionado a (o dentro de) un anticuerpo, tales como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para las células dendríticas.

15 En el presente documento se desvela además un ácido nucleico, que codifica los péptidos como se ha desvelado, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa (entera).

Se desvela además el ácido nucleico como se ha desvelado que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos.

20 Se desvela además en el presente documento un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico como se ha desvelado.

25 La presente divulgación se refiere además a un péptido como se ha desvelado, 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, en particular, en el tratamiento de cáncer uterino.

La presente divulgación se refiere además a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico como se ha desvelado o un vector de expresión como se ha desvelado en la invención.

30 Se desvela además en el presente documento la célula hospedadora como se ha desvelado en que es una célula presentadora de antígenos y preferentemente una célula dendrítica.

35 Se desvela además en el presente documento un método de producción de un péptido como se ha desvelado en el presente documento, comprendiendo dicho método cultivar la célula hospedadora como se desvela, y aislar el péptido de dicha célula hospedadora o su medio de cultivo.

40 Se desvela además el método como se ha descrito en el presente documento, en donde el antígeno se carga sobre moléculas MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Se desvela además el método como se ha descrito en el presente documento, en donde la célula presentadora de antígenos comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54 o dicha secuencia de aminoácidos variante.

45 También se desvelan en el presente documento células T activadas, producidas por el método como se desvela en el presente documento, en donde dichos linfocitos T reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento.

50 Se desvela además un uso que incluye destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento, comprendiendo el método administrar al paciente un número eficaz de linfocitos T como se desvela en el presente documento.

55 La presente divulgación se refiere además al uso de cualquier péptido descrito, un ácido nucleico como se desvela en el presente documento, un vector de expresión como se desvela en el presente documento, una célula como se desvela en el presente documento, o un linfocito T citotóxico activado como se desvela en el presente documento como un medicamento o en la fabricación de un medicamento. La presente invención se refiere a un uso como se desvela en el presente documento, en donde el medicamento es activo contra el cáncer.

60 La presente divulgación se refiere además a un uso como se desvela en el presente documento, en donde el medicamento es una vacuna. La presente invención se refiere a un uso como se desvela en el presente documento, en donde el medicamento es activo contra el cáncer.

65 Se desvela también un uso como se ha desvelado en el presente documento, en donde dichas células cancerosas son células cancerosas uterinas u otras células tumorales sólidas o hematológicas tales como leucemia mielógena aguda (AML), cáncer de mama, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (CLL),

carcinoma colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (HCC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no Hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y cáncer de vejiga urinaria.

5 Se desvelan además proteínas marcadoras y biomarcadores particulares basados en los péptidos como se desvela en el presente documento, en el presente documento denominados "dianas" que pueden usarse en el diagnóstico y/o el pronóstico de cáncer uterino. Se desvela también el uso de estas dianas para el tratamiento del cáncer.

10 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se usa en el presente documento en un sentido amplio e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o "completas", también se incluyen en el término "anticuerpos" son fragmentos (por ejemplo, CDR, fragmentos Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que presenten cualquiera de las propiedades deseadas (por ejemplo, unión específica de un (poli)péptido marcador de
15 cáncer uterino, administración de una toxina a una célula de cáncer uterino que expresa un gen marcador de cáncer a un nivel aumentado y/o inhibición de la actividad de un polipéptido marcador de cáncer uterino) como se desvela en el presente documento.

20 Siempre que sea posible, los anticuerpos pueden adquirirse de fuentes comerciales. Los anticuerpos también pueden generarse usando métodos bien conocidos. El experto comprenderá que pueden usarse polipéptidos marcadores de cáncer uterino de longitud completa o fragmentos de los mismos para generar los anticuerpos como se desvela en el presente documento. Un polipéptido a usar para generar un anticuerpo como se desvela en el presente documento puede purificarse parcial o totalmente a partir de una fuente natural o puede producirse usando técnicas de ADN recombinante.

25 Por ejemplo, un ADNc que codifica el péptido de acuerdo con la presente invención, puede expresarse en células procariotas (por ejemplo, bacterias) o células eucariotas (por ejemplo, células de levadura, de insectos o de mamíferos), después de lo cual el péptido recombinante puede purificarse y usarse para generar una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se usa específicamente al péptido marcador de cáncer uterino usado para
30 generar el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Un experto en la materia se dará cuenta de que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo con la especificidad y afinidad requeridas para su uso previsto (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, formación de imágenes *in vivo*, terapia con
35 inmunotoxinas). Los anticuerpos se prueban para determinar su actividad deseada mediante métodos conocidos, de acuerdo con el fin para el cual van a usarse los anticuerpos (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para obtener más orientación sobre la generación y la prueba de anticuerpos, véase, por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Por ejemplo, los anticuerpos pueden probarse en ensayos ELISA o, transferencias Western, tinción inmunohistoquímica de cánceres fijados con formalina o secciones de tejido congelado. Después de su
40 caracterización *in vitro* inicial, los anticuerpos destinados a fines terapéuticos o uso diagnóstico *in vivo* se prueban de acuerdo con métodos de prueba clínicos conocidos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la
45 población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos", en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de las cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes
50 en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad antagonista deseada (documento US 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando métodos de hibridoma. En un método de
55 hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales
60 como aquellos descritos en el documento US 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos).

65 Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede lograrse usando técnicas habituales

conocidas en la materia. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Algunos ejemplos de digestión con papaína se describen en los documentos WO 94/29348 y US 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'.

Los anticuerpos/fragmentos, ya sean unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, eliminaciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o se deteriore significativamente en comparación con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como eliminar/añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, para aumentar su biolongsitud, alterar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, tal como la actividad de unión, la regulación de la unión en el dominio de unión, etc. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo pueden identificarse mediante mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida de expresión y prueba del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto en la materia y pueden incluir mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab' u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

En la materia se conocen bien los métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (US 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Pueden emplearse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Los anticuerpos humanos también pueden producirse en bibliotecas de presentación en fagos.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento se administran preferentemente a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer isotónica la formulación. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Los vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para aquellas personas expertas en la materia que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración del anticuerpo que se administra.

Los anticuerpos pueden administrarse al sujeto, al paciente o a la célula mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular) o por otros métodos tales como infusión que aseguren su llegada al torrente sanguíneo de forma eficaz. Los anticuerpos también pueden administrarse por vías intratumoral o peritumoral, para

ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosificaciones eficaces y las pautas para administrar los anticuerpos pueden determinarse empíricamente, y realizar dichas determinaciones pertenece a las habilidades de la materia. Los expertos en la materia comprenderán que la dosificación de los anticuerpos que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el sujeto que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo usado y otros medicamentos que se administran. Una dosis diaria típica del anticuerpo usado solo podría variar de aproximadamente 1 (µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Después de la administración de un anticuerpo, preferentemente para el tratamiento de cáncer uterino, la eficacia del anticuerpo terapéutico puede evaluarse de diversas maneras bien conocidas por el profesional experto. Por ejemplo, el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en un sujeto que recibe tratamiento pueden controlarse usando técnicas convencionales de formación de imágenes de tumores. Un anticuerpo administrado terapéuticamente que detiene el crecimiento tumoral, da como resultado la reducción del tumor y/o previene el desarrollo de nuevos tumores, en comparación con el curso de la enfermedad que se produciría en ausencia de la administración de anticuerpos, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Es un aspecto adicional de la divulgación proporcionar un método para producir un receptor de linfocitos T soluble (sTCR) que reconoce (específicamente) un complejo péptido-MHC específico. Estos receptores de linfocitos T solubles pueden generarse a partir de clones de linfocitos T específicos y su afinidad puede aumentarse mediante mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de la complementariedad. Con el fin de la selección del receptor de linfocitos T, puede usarse la presentación en fagos (documento US 2010/0113300, (Liddy *et al.*, 2012)). Con el fin de estabilizar los receptores de linfocitos T durante la presentación en fagos y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta pueden unirse, por ejemplo, por enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocitos T de cadena sencilla), o por dominios de dimerización (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). El receptor de linfocitos T puede estar enlazado con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, el documento US 2013/0115191) y dominios que reclutan células efectoras tales como un dominio anti-CD3, etc., para ejecutar funciones particulares en las células diana. Por otra parte, podría expresarse en linfocitos T usados para la transferencia adoptiva. Puede encontrarse información adicional en los documentos WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En el documento WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. En el documento WO 2013/057586A1 se desvelan métodos adicionales para la producción.

Además, el péptido y/o los TCR o anticuerpo de la presente invención pueden usarse para verificar el diagnóstico de un cáncer por parte de un patólogo basándose en una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o los TCR también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionucleótido (tales como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de tal manera que el tumor pueda localizarse usando inmunogammagrafía. En una realización, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas mencionadas anteriormente y el valor de afinidad (Kd) es menos de $1 \times 10 \mu\text{M}$.

Los anticuerpos para su uso diagnóstico pueden marcarse con sondas adecuadas para la detección mediante diversos métodos de formación de imágenes. Los métodos para la detección de sondas incluyen, pero no se limitan a, microscopía de fluorescencia, óptico, confocal y electrónico; formación de imágenes por resonancia magnética y espectroscopia; fluoroscopia, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionucleidos emisores de positrones. Adicionalmente, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables mediante más de uno de los métodos enumerados. Estos anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La unión de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, incorporación de la sonda al anticuerpo y unión covalente de un compuesto quelante para la unión de la sonda, entre otros bien reconocidos en la técnica. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede estar fresca o congelada o puede embeberse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina. La sección fijada o embebida contiene la muestra y se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo se usa para detectar la expresión de las proteínas *in situ*.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el método poner en contacto *in vitro* linfocitos T con moléculas de MHC humano cargadas de antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar la célula T de una manera específica para el antígeno, en donde el antígeno es el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Preferentemente se usa una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígenos.

Preferentemente la célula de mamífero carece o tiene un nivel o función reducido del transportador peptídico TAP. Las células adecuadas que carecen del transportador peptídico TAP incluyen T2, RMA-S y células de *Drosophila*. TAP es el transportador asociado al procesamiento de antígenos.

La línea celular T2 con carga deficiente de péptidos humanos está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el número de catálogo CRL 1992; la línea celular de *Drosophila* Schneider línea 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la línea celular RMA-S de ratón se describe en Ljunggren *et al.* (Ljunggren y Karre, 1985).

Preferentemente, antes de la transfección la célula hospedadora no expresa sustancialmente ninguna molécula de MHC de clase I. También se prefiere que la célula estimuladora exprese una molécula importante para proporcionar una señal coestimuladora para linfocitos T tales como cualquiera de B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas del MHC de clase I y de las moléculas coestimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

En caso de que se use un epítipo del MHC de clase I como antígeno, los linfocitos T son linfocitos T CD8 positivos.

Si se transfecta una célula presentadora de antígenos para expresar un epítipo tal, preferentemente la célula comprende un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contiene SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54, o una secuencia de aminoácidos variante del mismo.

Pueden usarse varios otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, pueden usarse linfocitos autólogos infiltrantes de tumores en la generación de CTL. Plebanski *et al.* (Plebanski *et al.*, 1995) hicieron uso de linfocitos de sangre periférica (PLB) autólogos en la preparación de linfocitos T. Adicionalmente, es posible la producción de linfocitos T autólogos pulsando células dendríticas con péptidos o polipéptidos, o mediante infección con virus recombinantes. También, los linfocitos B pueden usarse en la producción de linfocitos T autólogos. Además, los macrófagos pulsados con péptido o polipéptido, o infectados con virus recombinantes, pueden usarse en la preparación de linfocitos T autólogos. Walter S. *et al.* (Walter *et al.*, 2003) describen el cebado *in vitro* de linfocitos T mediante el uso de células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC), que también es una forma adecuada de generar linfocitos T contra el péptido de elección. En el presente caso, las aAPC se generaron mediante el acoplamiento de complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (micropelotas) mediante bioquímica de biotina:estreptavidina. Este sistema permite el control exacto de la densidad del MHC en aAPC, lo que permite provocar selectivamente respuestas de linfocitos T específicas de antígeno de alta o baja avididad con alta eficiencia a partir de muestras de sangre. Aparte de los complejos MHC:péptido, las aAPC deberían transportar otras proteínas con actividad coestimuladora como anticuerpos anti-CD28 acopladas a su superficie. Además, estos sistemas basados en aAPC a menudo requieren la adición de factores solubles apropiados, por ejemplo, citocinas, como interleucina-12.

También pueden usarse células alogénicas en la preparación de linfocitos T y un método se describe en detalle en el documento WO 97/26328. Por ejemplo, además de las células de *Drosophila* y las células T2, pueden usarse otras células para presentar antígenos tales como las células CHO, células de insecto infectadas por baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con vaccinia. Además pueden usarse virus de plantas (véase, por ejemplo, Porta *et al.* (Porta *et al.*, 1994) que describe el desarrollo del virus del mosaico del caupí como un sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños.

Los linfocitos T activados que se dirigen contra el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 son útiles en terapia. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona linfocitos T activados que pueden obtenerse mediante el método anterior de la invención.

Los linfocitos T activados, que se producen mediante el método anterior, reconocerán selectivamente una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO 54.

Preferentemente, la célula T reconoce la célula interactuando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido (por ejemplo, unión). Las células T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento, en donde se administra al paciente un número eficaz de las células T activadas. Los linfocitos T que se administran al paciente pueden derivar del paciente y activarse como se describe anteriormente (es decir, son linfocitos T autólogos). Alternativamente, los linfocitos T no son del paciente sino de otro individuo. Por supuesto, se prefiere si el individuo es un individuo sano. Por "individuo sano" los inventores quieren decir que el individuo goza generalmente de buena salud, preferentemente tiene un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no padece ninguna enfermedad que pueda detectarse y examinarse fácilmente.

In vivo, las células diana para los linfocitos T CD8 positivos pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales que rodean el tumor (células tumorales) (que a veces también expresan MHC de clase II; (Dengjel *et al.*, 2006)).

Los linfocitos T como se desvela en el presente documento pueden usarse como principios activos de una composición terapéutica. Se desvela adicionalmente un uso que implica destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente

documento, comprendiendo el método administrar al paciente un número eficaz de linfocitos T como se define anteriormente.

Por "expresado de manera aberrante" los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles de expresión en tejidos normales o que el gen es silencioso en el tejido del que deriva el tumor pero en el tumor se expresa. Por "sobreexpresado" los inventores quieren decir que el polipéptido está presente en un nivel al menos 1,2 veces mayor que el presente en el tejido normal; preferentemente al menos 2 veces, y más preferentemente al menos 5 veces o 10 veces el nivel presente en el tejido normal.

Pueden obtenerse linfocitos T por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los descritos anteriormente.

Los protocolos para esta denominada transferencia adoptiva de linfocitos T son bien conocidos en la técnica. Las revisiones pueden encontrarse en: Gattioni et al. y Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan *et al.*, 2006).

También se desvela el uso de los péptidos complejados con MHC para generar un receptor de linfocitos T cuyo ácido nucleico se clona y se introduce en una célula hospedadora, preferentemente una célula T. Esta célula T modificada puede después transferirse a un paciente para la terapia del cáncer.

Cualquier molécula desvelada en el presente documento, es decir, el péptido, el ácido nucleico, el anticuerpo, el vector de expresión, la célula, el linfocito T activado, el receptor de linfocitos T o el ácido nucleico que lo codifica, es útil para el tratamiento de la trastornos, caracterizado por células que escapan a una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, cualquier molécula desvelada en el presente documento puede usarse como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede usarse sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o (una) molécula o moléculas conocidas.

La presente invención se dirige además a un kit que comprende:

(a) un recipiente que contiene una composición farmacéutica como se describe anteriormente, en solución o en forma liofilizada;

(b) opcionalmente un segundo recipiente que contiene un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada; y

(c) opcionalmente, instrucciones para (i) uso de la solución o (ii) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

El kit puede comprender además uno o más de (iii) un tampón, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja o (v) una jeringa. El recipiente es preferentemente un frasco, un vial, una jeringa o tubo de ensayo; y puede ser un recipiente de usos múltiples. La composición farmacéutica está preferentemente liofilizada.

El kit de la presente invención comprende preferentemente una formulación liofilizada como se desvela en el presente documento en un recipiente adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de dos cámaras) y tubos de ensayo. El recipiente puede formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. Preferentemente el kit y/o el recipiente contienen instrucciones sobre o asociadas con el recipiente que indican instrucciones para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se va a reconstituir a concentraciones de péptido como se describe anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea.

El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, lo que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, solución de bicarbonato sódico).

Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de péptido en la formulación reconstituida es preferentemente al menos 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferentemente no más de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de uso.

El kit de la presente invención puede tener un único recipiente que contiene la formulación de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención con o sin otros componentes (por ejemplo, otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o puede tener un recipiente distinto para cada componente.

Preferentemente, el kit de la invención incluye una formulación de la invención envasada para su uso en combinación con la coadministración de un segundo compuesto (tal como adyuvantes (por ejemplo, GM-CSF), un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o antagonista, un agente o inhibidor antiangiogénesis, un agente inductor de apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica del mismo. Los componentes del kit pueden estar precomplejados o cada componente puede estar en un recipiente distinto antes de la administración a un paciente. Los componentes del kit pueden proporcionarse en una o más soluciones líquidas, preferentemente, una solución acuosa, más preferentemente, una solución acuosa estéril. Los componentes del kit también pueden

proporcionarse como sólidos, que pueden convertirse en líquidos mediante la adición de disolventes adecuados, que se proporcionan preferentemente en otro recipiente distinto.

El recipiente de un kit terapéutico puede ser un vial, un tubo de ensayo, un matraz, un frasco, una jeringa o cualquier otro medio para encerrar un sólido o líquido. Habitualmente, cuando hay más de un componente, el kit contendrá un segundo vial u otro recipiente, lo que permite una dosificación separada. El kit también puede contener otro recipiente para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, un kit terapéutico contendrá un aparato (por ejemplo, una o más agujas, jeringas, cuentagotas para los ojos, pipeta, etc.), lo que permite la administración de los agentes como se desvelan en el presente documento que son componentes del presente kit.

La presente formulación es adecuada para la administración de los péptidos por cualquier vía aceptable tal como oral (enteral), nasal, oftal, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferentemente, la administración es s.c. y lo más preferentemente i.d. La administración puede ser mediante bomba de infusión.

Dado que los péptidos de la divulgación se aislaron de cáncer uterino, el medicamento desvelado en el presente documento se usa preferentemente para tratar el cáncer uterino.

Se desvela además un método para producir un producto farmacéutico personalizado para un paciente individual que comprende fabricar una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado de un almacén de TUMAP preseleccionados, en donde al menos un péptido usado en la composición farmacéutica se selecciona por adecuabilidad en el paciente individual. En una realización, la composición farmacéutica es una vacuna. El método también podría adaptarse para producir clones de linfocitos T para aplicaciones posteriores, tales como aislamientos de TCR o anticuerpos solubles y otras opciones de tratamiento.

Un "producto farmacéutico personalizado" significará terapias específicamente diseñadas para un paciente individual que solo se usarán para la terapia en dicho paciente individual, incluyendo vacunas contra el cáncer activamente personalizadas y terapias celulares adoptivas que usan tejido autólogo de pacientes.

Como se usa en el presente documento, el término "almacén" se referirá a un grupo o conjunto de péptidos que han sido previamente seleccionados para determinar su inmunogenicidad y/o sobrerepresentación en un tipo de tumor particular. El término "almacén" no pretende implicar que los péptidos particulares incluidos en la vacuna hayan sido prefabricados y almacenados en una instalación física, aunque se contempla esa posibilidad. Se contempla expresamente que los péptidos puedan fabricarse *de novo* para cada vacuna individualizada producida o que puedan prefabricarse y almacenarse. El almacén (por ejemplo, en forma de base de datos) está compuesto por péptidos asociados a tumores que estaban altamente sobreexpresados en el tejido tumoral de pacientes con cáncer uterino con diversos alelos HLA-A HLA-B y HLA-C. Puede contener péptidos MHC de clase I y MHC de clase II o péptidos de MHC de clase I alargados. Además de los péptidos asociados a tumores recogidos de varios tejidos de cáncer uterino, el almacén puede contener péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten comparar la magnitud de la inmunidad de los linfocitos T inducida por TUMAP de manera cuantitativa y, por lo tanto, permiten extraer conclusiones importantes sobre la capacidad de la vacuna para provocar respuestas antitumorales. En segundo lugar, funcionan como importantes péptidos de control positivo derivados de un antígeno "no propio" en el caso de que no se observe ninguna respuesta de linfocitos T inducida por la vacuna a los TUMAP derivados de antígenos "propios" en un paciente. Y en tercer lugar, puede permitir sacar conclusiones, respecto al estado de inmunocompetencia del paciente.

Los TUMAP para el almacén se identifican mediante el uso de un enfoque de genómica funcional integrada que combina análisis de expresión génica, espectrometría de masas e inmunología de linfocitos T (XPresident[®]). El enfoque garantiza que solo los TUMAP realmente presentes en un alto porcentaje de tumores, pero no se expresen o solo se expresen mínimamente en tejido normal, se eligen para su análisis adicional. Para la selección inicial de péptidos, se analizaron muestras de cáncer uterino de pacientes y sangre de donantes sanos siguiendo un enfoque paso a paso:

1. Los ligandos HLA del material neoplásico maligno se identificaron por espectrometría de masas
2. Se usó análisis de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en todo el genoma para identificar genes sobreexpresados en el tejido neoplásico maligno (cáncer uterino) en comparación con una serie de órganos y tejidos normales
3. Los ligandos HLA identificados se compararon con los datos de expresión génica. Los péptidos sobrerepresentados o presentados selectivamente en tejido tumoral, preferentemente codificados por genes expresados selectivamente o sobreexpresados como se detectó en la etapa 2, se consideraron candidatos TUMAP adecuados para una vacuna de péptidos múltiples.
4. Se realizó una investigación bibliográfica para identificar evidencia adicional que respalde la relevancia de los péptidos identificados como TUMAP
5. La relevancia de la sobreexpresión a nivel de ARNm se confirmó mediante la redetección de TUMAP seleccionados de la etapa 3 en tejido tumoral y la falta de detección (o detección infrecuente) en tejidos sanos.
6. Para evaluar, si una inducción de las respuestas de los linfocitos T *in vivo* mediante los péptidos seleccionados pueden ser factibles, se realizaron ensayos de inmunogenicidad *in vitro* usando células T humanas de donantes

sanos así como de pacientes con cáncer uterino.

En un aspecto, los péptidos se analizan previamente para determinar su inmunogenicidad antes de incluirlos en el almacén. A modo de ejemplo y no de limitación, la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en el almacén se determina mediante un método que comprende el cebado de linfocitos T *in vitro* mediante estimulaciones repetidas de linfocitos T CD8+ de donantes sanos con células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28.

Este método se prefiere para cánceres raros y pacientes con un perfil de expresión raro. A diferencia de los cócteles multipéptidos con una composición fija como los desarrollados actualmente, el almacén permite una correspondencia significativamente mayor de la expresión real de los antígenos en el tumor con la vacuna. Se usarán péptidos únicos o combinaciones de varios péptidos "disponibles en el mercado" seleccionados para cada paciente en un enfoque de múltiples dianas. En teoría, un enfoque basado en la selección de, por ejemplo, 5 péptidos antigénicos diferentes de una biblioteca de 50 ya darían lugar a aproximadamente 17 millones de posibles composiciones de medicamento (DP).

En un aspecto, los péptidos se seleccionan para su inclusión en la vacuna basándose en su idoneidad para el paciente individual basándose en el método descrito en el presente documento, o como a continuación.

El fenotipo HLA, los datos transcriptómicos y peptidómicos se recopilan del material tumoral del paciente y de muestras de sangre para identificar los péptidos más adecuados para cada paciente que contienen TUMAP "de almacén" y únicos para el paciente (es decir, mutados). Se elegirán esos péptidos, que se expresan selectivamente o sobreexpresados en el tumor del paciente y, cuando sea posible, que muestran fuerte inmunogenicidad *in vitro* si se prueban con las PBMC individuales de los pacientes.

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante un método que comprende: (a) identificar péptidos asociados a tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor del paciente individual; (b) comparar los péptidos identificados en (a) con un almacén (base de datos) de péptidos como se describe anteriormente; y (c) seleccionar al menos un péptido del almacén (base de datos) que se correlacione con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP presentados por la muestra tumoral se identifican mediante: (a1) comparar los datos de expresión de la muestra de tumor con los datos de expresión de una muestra de tejido normal correspondiente al tipo de tejido de la muestra de tumor para identificar proteínas que están sobreexpresadas o expresadas de forma aberrante en la muestra de tumor; y (a2) correlacionar los datos de expresión con secuencias de ligandos de MHC unidos a moléculas de MHC de clase I y/o clase II en la muestra de tumor para identificar ligandos de MHC derivados de proteínas sobreexpresadas o expresadas de manera aberrante por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos del MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos de las moléculas del MHC aisladas de la muestra del tumor y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra del tumor y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

Además de o como una alternativa a, seleccionar péptidos usando un modelo de almacenamiento (base de datos), los TUMAP pueden identificarse en el paciente *de novo* y después incluirlos en la vacuna. Como un ejemplo, los TUMAP candidatos pueden identificarse en el paciente mediante (a1) comparar los datos de expresión de la muestra de tumor con los datos de expresión de una muestra de tejido normal correspondiente al tipo de tejido de la muestra de tumor para identificar proteínas que están sobreexpresadas o expresadas de forma aberrante en la muestra de tumor; y (a2) correlacionar los datos de expresión con secuencias de ligandos de MHC unidos a moléculas de MHC de clase I y/o clase II en la muestra de tumor para identificar ligandos de MHC derivados de proteínas sobreexpresadas o expresadas de manera aberrante por el tumor. Como otro ejemplo, pueden identificarse proteínas que contienen mutaciones que son exclusivas de la muestra de tumor en relación con el tejido normal correspondiente del paciente individual y pueden identificarse TUMAP que se dirigen específicamente a la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y del tejido normal correspondiente puede secuenciarse mediante secuenciación del genoma completo. Para el descubrimiento de mutaciones no sinónimas en las regiones de genes que codifican proteínas, el ADN y el ARN genómicos se extraen de tejidos tumorales y el ADN de la línea germinal genómica normal no mutado se extrae de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El enfoque NGS aplicado se limita a la resecuenciación de regiones codificantes de proteínas (resecuenciación del exoma). Con este fin, el ADN exónico de muestras humanas se captura usando kits de enriquecimiento de dianas proporcionados por el proveedor, seguido de secuenciación con por ejemplo un HiSeq2000 (Illumina). Adicionalmente, el ARNm del tumor se secuencia para la cuantificación directa de la expresión genética y la validación de que los genes mutados se expresan en los tumores de los pacientes. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan mediante algoritmos de software. La lista de resultados contiene mutaciones y expresión genética. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan en comparación con las variaciones de la línea germinal derivadas de PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden probarse después para determinar su inmunogenicidad como se describió anteriormente para el almacén y los TUMAP candidatos que poseen una inmunogenicidad adecuada se seleccionan para su inclusión en la vacuna.

En una realización ilustrativa, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificar péptidos asociados a tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor del paciente individual mediante el método descrito anteriormente; (b) comparar los péptidos identificados en a) con un almacén de péptidos que se han preseleccionado en cuanto a inmunogenicidad y sobrerepresentación en tumores en comparación con el tejido normal

correspondiente; (c) seleccionar al menos un péptido del almacén que se correlacione con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, seleccionar al menos un péptido identificado *de novo* en (a) confirmando su inmunogenicidad.

- 5 En una realización ilustrativa, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificar péptidos asociados a tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor del paciente individual; y (b) seleccionar al menos un péptido identificado *de novo* en (a) y confirmando su inmunogenicidad.

- 10 Una vez seleccionados los péptidos para una vacuna personalizada basada en péptidos, se produce la vacuna. La vacuna es preferentemente una formulación líquida que consta de péptidos individuales disueltos en entre el 20-40 % de DMSO, con preferencia aproximadamente el 30-35 % de DMSO, tal como aproximadamente el 33 % de DMSO.

- 15 Cada péptido que se incluirá en un producto se disuelve en DMSO. La concentración de las soluciones de péptidos individuales debe elegirse dependiendo del número de péptidos que se incluirán en el producto. Las soluciones de péptido único-DMSO se mezclan en partes iguales para lograr una solución que contenga todos los péptidos que se incluirán en el producto con una concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye después 1:3 con agua para inyección para lograr una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33 %. La solución diluida se filtra a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución a granel final.

- 20 La solución a granel final se vierte en viales y se almacena a -20 °C hasta su uso. Un vial contiene 700 µl de solución, que contiene 0,578 mg de cada péptido. De esto, se aplicarán 500 µl (aproximadamente 400 µg por péptido) para inyección intradérmica.

- 25 Además de ser útil para tratar el cáncer, el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma, también es útil como un diagnóstico. Ya que el péptido de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 se generó a partir de células de cáncer uterino y ya que se determinó que este péptido no está presente, o lo está en niveles más bajos, en los tejidos normales, este péptido puede usarse para diagnosticar la presencia de un cáncer.

- 30 La presencia del péptido de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 en biopsias de tejido en muestras de sangre puede ayudar a un patólogo en el diagnóstico del cáncer. La detección del péptido mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica pueden indicarle al patólogo que la muestra de tejido es neoplásica maligna o inflamada o generalmente enferma, o puede usarse como biomarcador para cáncer uterino. La presencia de los grupos de péptidos desvelados en el presente documento puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

- 35 La detección del péptido en muestras de tejido enfermo puede permitir tomar decisiones sobre el beneficio de terapias que implican al sistema inmunitario, especialmente si se sabe o se espera que los linfocitos T participen en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión del MHC es un mecanismo bien descrito por el cual las células malignas infectadas escapan a la inmunovigilancia. Por lo tanto, la presencia de péptidos muestra que este mecanismo no se aprovecha por las células analizadas.

- 45 El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12, o que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y un aminoácido adicional unido al extremo N- y/o C-terminal de la misma, podría usarse para analizar respuestas de linfocitos contra el péptido, tales como respuestas de células T o respuestas de anticuerpos contra el péptido o el péptido complejo con moléculas MHC. Estas respuestas de linfocitos pueden usarse como marcadores de pronóstico para tomar decisiones sobre etapas terapéuticas adicionales. Estas respuestas también pueden usarse como marcadores de respuesta sustitutos en enfoques de inmunoterapia destinados a inducir respuestas de linfocitos por diferentes medios, por ejemplo, vacunación de proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, transferencia adoptiva de linfocitos. En entornos de terapia génica, las respuestas de los linfocitos contra los péptidos pueden considerarse en la evaluación de los efectos secundarios. La monitorización de las respuestas de los linfocitos también podría ser una herramienta valiosa para los exámenes de seguimiento de las terapias de trasplante, por ejemplo, para la detección de enfermedades de injerto contra hospedador y hospedador contra injerto.

La presente invención se describirá ahora en los siguientes ejemplos que describen realizaciones preferidas de la misma, y con referencia a las figuras adjuntas, sin embargo, sin limitarse a las mismas.

- 60 Las Figuras 1A a 1I muestran la sobrerepresentación de diversos péptidos en tejidos normales (barras blancas) y en cáncer uterino (barras negras). Figura 1A) Símbolo del gen: PIGR, Péptido: RLDIQGTGQLL (SEQ ID NO.: 4), Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 4 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 8 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 46 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroides, 1 peritoneo, 5 glándulas pituitarias, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazo, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroideas,

- 10 tráqueas, 6 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 15 muestras de cáncer uterino. Figura 1B) Símbolo del gen: STX18, Péptido: SLFDEVRQI (SEQ ID NO: 5), Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 4 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 8 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 46 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroides, 1 peritoneo, 5 glándulas pituitarias, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroideas, 10 tráqueas, 6 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 15 muestras de cáncer uterino. El péptido se ha detectado adicionalmente en 1/84 muestras de cáncer de pulmón no microcítico; Figura 1C) Símbolo del gen: LIG3, Péptido: VLLDIFTGV (SEQ ID NO: 2), Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 4 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 8 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 46 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroides, 1 peritoneo, 5 glándulas pituitarias, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroideas, 10 tráqueas, 6 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 15 muestras de cáncer uterino. El péptido se ha detectado adicionalmente en 4/18 muestras de leucemia mieloide aguda, en 4/14 muestras de cáncer de próstata, en 3/18 muestras de cáncer de mama, en 2/17 muestras de leucemia linfocítica crónica, en 1/17 muestras de cáncer colorrectal, en 1/17 muestras de cáncer de vesícula y conducto biliar, en 2/19 muestras de cáncer hepatocelular, en 3/17 muestras de melanoma, en 4/20 muestras de linfoma, en 4/20 muestras de cáncer de ovario, en 1/17 muestras de cáncer de esófago, en 1/19 muestras de cáncer de páncreas, en 3/31 muestras de cáncer de cerebro, en 2/15 muestras de cáncer de vejiga urinaria y en 3/84 muestras de cáncer de pulmón no microcítico. Figura 1D) Símbolo del gen: SEMA4C, Péptido: GLDGATYTV (SEQ ID NO: 3), Muestras de izquierda a derecha: 3 líneas celulares (1 células sanguíneas, 1 pancreática, 1 cutánea), 2 tejidos normales (1 placenta, 1 útero), 20 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 1 cáncer de hígado, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ganglios linfáticos, 2 cánceres de próstata, 3 melanomas, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres uterinos). Figura 1E: Símbolo del gen: TRIM5; Péptido: SVMELLQGV (SEQ ID NO: 8); Tejidos de izquierda a derecha: 4 líneas celulares (4 linfocitos), 8 tejidos normales (1 riñón, 1 hígado, 1 placenta, 1 próstata, 1 intestino delgado, 1 glándula tiroidea, 2 úteros), 32 tejidos cancerosos (3 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de próstata, 1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de colon, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 3 cánceres de hígado, 5 cánceres de cabeza y cuello, 3 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 6 cánceres de pulmón, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres de útero); Figura 1F: Símbolo del gen: GLYATL2; Péptido: VLGPEGQLV (SEQ ID NO: 21); Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido normal (1 tráquea), 12 tejidos cancerosos (1 cáncer de próstata, 2 cánceres de mama, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de pulmón, 6 cánceres de útero); Figura 1G: Símbolo del gen: FRG1B; Péptido: TLLDRVAVI (SEQ ID NO: 30); Tejidos de izquierda a derecha: 2 líneas celulares (1 leucocito, 1 riñón), 5 tejidos normales (1 colon, 1 hígado, 1 ganglio linfático, 1 intestino delgado, 1 bazo), 27 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de mama, 3 cánceres de leucemia leucocítica, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de recto, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 2 cánceres de hígado, 1 cáncer de cabeza y cuello, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de cerebro, 3 cánceres de pulmón, 1 cáncer de riñón, 1 cáncer de vejiga urinaria, 2 cánceres de útero); Figura 1H: Símbolo del gen: RNF145; Péptido: NMDDVIYYV (SEQ ID NO: 46); Tejidos de izquierda a derecha: 1 línea celular (1 páncreas), 5 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales, 1 bazo, 2 tráqueas), 37 tejidos cancerosos (3 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de próstata, 1 cáncer de colon, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de hígado, 3 cánceres de cabeza y cuello, 4 cánceres de piel, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 2 cánceres de estómago, 5 cánceres de pulmón, 2 cánceres de vejiga urinaria, 4 cánceres de útero); Figura 1I: Símbolo del gen: ADNP2; Péptido: VMHDSSFSV (SEQ ID NO: 53); Tejidos de izquierda a derecha: 8 líneas celulares (1 vejiga urinaria, 1 linfocito, 1 leucocito, 1 piel, 2 próstatas, 2 páncreas), 24 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales, 1 esófago, 1 ojo, 1 cabeza y cuello, 1 riñón, 1 recto, 2 pulmones, 2 ganglios linfáticos, 1 páncreas, 1 peritoneo, 4 placentas, 1 próstata, 2 intestinos delgados, 2 glándulas tiroideas, 2 úteros), 98 tejidos cancerosos (3 cánceres de leucemia leucocítica, 6 cánceres de próstata, 4 cánceres de mama, 1 cáncer colorrectal, 1 cáncer de colon, 3 cánceres de recto, 1 cáncer del conducto biliar, 2 cánceres de vesícula biliar, 3 cánceres de hígado, 4 cánceres de cabeza y cuello, 5 cánceres de piel, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 4 cánceres de ovario, 5 cánceres esofágicos, 2 cánceres de páncreas, 11 cánceres de cerebro, 25 cánceres de pulmón, 1 cáncer de riñón, 7 cánceres de vejiga urinaria, 5 cánceres de útero).
- 55 Las Figuras 1A a 2D muestran perfiles de expresión ilustrativos de genes fuente desvelados en el presente documento que están altamente sobreexpresados o expresados exclusivamente en cáncer uterino en un panel de tejidos normales (barras blancas) y 10 muestras de cáncer uterino (barras negras). Tejidos de izquierda a derecha: 6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 glándulas pituitarias, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroidea, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo, 1 útero, 10 muestras de cáncer uterino. Figura 2A) Símbolo del gen: MSX1, Figura 2B) Símbolo del gen: NXNL2, Figura 2C) Símbolo del gen: TMEM101 y Figura 2D) Símbolo genético: STX18.
- 65 La Figura 2 muestra datos de inmunogenicidad ilustrativos: resultados de citometría de flujo después de la tinción de multímeros específicos de péptidos.

La Figura 4 muestra resultados ilustrativos de respuestas de linfocitos T CD8+ *in vitro* específicas de péptido de un donante sano HLA-A*02+. Las células T CD8+ se cebaron usando APC artificiales recubiertas con mAb anti-CD28 y HLA-A*02 en complejo con el péptido SEQ ID NO: 2 (A, panel izquierdo), péptido SEQ ID NO: 7 (B, panel izquierdo) y péptido SEQ ID NO: 23 (C, panel izquierdo), respectivamente. Después de tres ciclos de estimulación, la detección de células reactivas al péptido se realizó mediante tinción 2D multimérica con A*02/SEQ ID NO: 2 (A), A*02/SEQ ID NO: 7 (B) o A*02/SEQ ID NO: 23 (C). Los paneles de la derecha (A, B y C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*02/péptido irrelevantes. Se seleccionaron células singletes viables para detectar linfocitos CD8+. Las puertas booleanas ayudaron a excluir eventos falsos positivos detectados con multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

Ejemplos

EJEMPLO 1

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de los pacientes se obtuvieron de: Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); y Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK).

Los tejidos normales se obtuvieron de Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU); Bio-Options Inc. (Brea, CA, EE.UU.); BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE.UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); Universidad Prefectural de Medicina de Kioto (KPUM) (Kioto, Japón); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, RU); Hospital Universitario de Ginebra (Ginebra, Suiza); Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania); Hospital Universitario de Múnich (Múnich, Alemania); y Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

Se otorgaron consentimientos informados por escrito de todos los pacientes antes de la cirugía o la autopsia. Los tejidos se congelaron inmediatamente después de la escisión y se almacenaron hasta el aislamiento de TUMAP a -70 °C o menos.

Aislamiento de péptidos HLA de muestras de tejido

Se obtuvieron conjuntos de péptidos HLA de muestras de tejido congeladas por choque mediante inmunoprecipitación de tejidos sólidos de acuerdo con un protocolo ligeramente modificado (Falk et al., 1991; Seeger *et al.*, 1999) usando el anticuerpo BB7.2 específico de HLA-A*02, el anticuerpo específico de HLA-A, -B, -C W6/32, sefarsa activada por CNBr, tratamiento ácido y ultrafiltración.

Análisis de espectrometría de masas

Los grupos de péptidos HLA obtenidos se separaron de acuerdo con su hidrofobicidad mediante cromatografía de fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron en LTQ-velos y espectrómetros de masas híbridos de fusión (ThermoElectron) equipados con una fuente ESI. Los grupos de péptidos se cargaron directamente en la columna microcapilar analítica de sílice fundida (75 µm d.i. × 250 mm) empaquetado de material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente, los péptidos se separaron usando un gradiente binario de 180 minutos en dos etapas del 10 % al 33 % de B a un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por el disolvente A (0,1 % de ácido fórmico en agua) y el disolvente B (0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo). Se usó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective) para la introducción en la fuente nanoESI. Los espectrómetros de masas LTQ-Orbitrap se operaron en modo dependiente de los datos usando una estrategia TOP5. En síntesis, se inició un ciclo de escaneo con un escaneo completo de alta precisión de masa en orbitrap (R = 30 000), seguido de escaneos EM/EM también en orbitrap (R = 7500) en los 5 iones precursores más abundantes con exclusión dinámica de iones previamente seleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron mediante SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se aseguró mediante la comparación del patrón de fragmentación del péptido natural generado con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia de secuencia idéntica sintética.

La cuantificación relativa de CL-EM sin marcadores se realizó mediante recuento de iones, es decir, mediante extracción y análisis de características de CL-EM (Mueller *et al.*, 2007). El método supone que el área de señal CL-EM del péptido se correlaciona con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron adicionalmente mediante desconvolución del estado de carga y alineación del tiempo de retención (Mueller et al., 2008; Sturm *et al.*, 2008). Finalmente, todas las características de CL-EM se cruzaron con los resultados de la identificación de secuencias para combinar datos cuantitativos de diferentes muestras y tejidos con perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en dos niveles de acuerdo con la tendencia central

para tener en cuenta la variación dentro de las réplicas técnicas y biológicas. Por lo tanto cada péptido identificado puede asociarse con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Además, todos los datos cuantitativos adquiridos para los péptidos candidatos se inspeccionaron manualmente para garantizar la coherencia de los datos y verificar la precisión del análisis automatizado. Para cada péptido se calculó un perfil de presentación que muestra la presentación media de la muestra así como variaciones replicadas. Los perfiles yuxtaponen muestras de cáncer uterino con una línea de base de muestras de tejido normal. En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerepresentados ilustrativos. Las puntuaciones de presentación de los péptidos ilustrativos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera los péptidos que están muy sobrerepresentados en los tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+++), altamente sobrerepresentados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (++) o sobrerepresentados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+). El panel de tejidos normales considerado relevante para la comparación con tumores consistía en: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, nervio central, colon, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos, páncreas, glándula paratiroidea, nervio periférico, peritoneo, hipófisis, pleura, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter, vejiga urinaria, vena.

SEQ ID NO:	Secuencia	Presentación de péptidos
1	KLLDNLHDL	+++
2	VLLDIFTGV	+++
3	GLDGATYTV	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEVRI	+++
6	SLLSELVEA	++
7	SILSLLIKL	++
8	SVMELLQGV	++
9	SLYPGTETM	+
10	AILDVVVNL	+
12	ALAPSEGVQAA	+++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	+++
15	GLLSVELRV	+++
16	KLNSSIQYV	+++
17	KLWEESTAQV	+++
18	SLLRCPAKA	+++
19	YLETMNITL	+++
20	ALLGFVTDL	+++
22	VLVSSVLGV	+++
24	ILDAQTAFV	+
25	ILLELFTHV	++
26	SVLAGVVG	++
27	VLNPETTVV	+
34	AIAGRLLGV	+++
35	TLLPTLYEI	++
36	SLLSDIAL	+

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Presentación de péptidos
37	VLLATVTEL	+
39	ALDGKIYEL	+
41	YIDDIFSGV	+++
42	FLSGYYVTL	+
46	NMDDVIYYV	+
48	ILAETQPEL	+
49	ALLELLHEL	++
50	TLSTVIATV	+
52	ALISEKLETL	+
53	VMHDSSFSV	+
54	TLSDVVVGL	++

EJEMPLO 2

5 Perfilado de expresión de genes que codifican los péptidos de la divulgación

La sobrerepresentación o la presentación específica de un péptido en células tumorales en comparación con las células normales es suficiente para su utilidad en inmunoterapia y algunos péptidos son específicos de tumores a pesar de que su proteína fuente también se encuentra en tejidos normales. Todavía, el perfilado de expresión de ARNm añade un nivel adicional de seguridad en la selección de dianas peptídicas para inmunoterapias. Especialmente para opciones terapéuticas con altos riesgos de seguridad, tales como TCR madurados por afinidad, el péptido diana ideal derivará de una proteína que es exclusiva del tumor y no se encuentra en los tejidos normales.

15 Fuentes y preparación de ARN

Se proporcionaron muestras de tejido extirpadas quirúrgicamente como se indicó anteriormente (véase el Ejemplo 1) después de obtener el consentimiento informado por escrito de cada paciente. Las muestras de tejido tumoral se congelaron inmediatamente después de la cirugía y después se homogeneizaron con mortero y maja en nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras usando el reactivo TRI (Ambion, Darmstadt, Alemania) seguido de una limpieza con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El ARN total de tejidos humanos sanos para experimentos de Sec. de ARN se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU); BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania); BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE.UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Nápoles, Italia); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.); y Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania). El ARN total de tejidos tumorales para experimentos de Sec. de ARN se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE.UU. y Royston, Herts, RU); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); y Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK). La calidad y cantidad de todas las muestras de ARN se evaluaron en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) usando el kit RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

30 Experimentos de Sec. de ARN

El análisis de la expresión génica de muestras de ARN de tejido normal y tumoral se realizó mediante secuenciación de última generación (Sec. de ARN) por CeGaT (Tübingen, Alemania). Resumiendo, las bibliotecas de secuenciación se preparan usando el kit de reactivos Illumina HiSeq v4 de acuerdo con el protocolo del proveedor (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.), que incluye fragmentación del ARN, conversión de ADNc y adición de adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas de múltiples muestras se mezclan de forma equimolar y se secuencian en el secuenciador Illumina HiSeq 2500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, generando lecturas de un solo extremo de 50 pb. Las lecturas procesadas se asignan al genoma humano (GRCh38) usando el software STAR. Los datos de expresión se proporcionan a nivel de transcripción como RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas, generado por el software Cufflinks) y a nivel de exón (lecturas totales, generadas por el software Bedtools), basado en anotaciones de la base de datos de secuencias de conjunto (Ensembl77). Las lecturas de exones se normalizan según la longitud del exón y el tamaño de alineación para obtener valores de RPKM.

En la Figura 2 se muestran ejemplos de perfiles de expresión de genes fuente muy sobreexpresados o exclusivamente expresados en el cáncer uterino. Las puntuaciones de expresión de genes ilustrativos adicionales se muestran en la Tabla 9.

- 5 Tabla 9: Puntuaciones de expresión. La tabla enumera los péptidos de genes que están altamente sobreexpresados en los tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+++), altamente sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (++) o sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+). El valor inicial para esta puntuación se calculó a partir de mediciones de los siguientes tejidos
- 10 normales relevantes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, glóbulos sanguíneos, médula ósea, cerebro, cartilago, colon, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, páncreas, nervio periférico, hipófisis, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroidea, glándula tiroidea, tráquea, vejiga urinaria y vena. En caso de que estuvieran disponibles datos de expresión para varias muestras del mismo tipo de tejido, se usó la media aritmética de todas las muestras respectivas para el cálculo.

SEQ ID NO:	Secuencia	Expresión génica
1	KLLDNLHDL	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEVQRQI	+++
12	ALAPSEGVQAA	+++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	++
15	GLLSVELRV	+
21	VLGPEGQLV	+++
28	GLDEAIRKV	+++
42	FLSGYYVTL	+++
43	VIANEIEKV	++
48	ILAETQPEL	+++
52	ALISEKLETL	++

15 EJEMPLO 3

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

- 20 Para obtener información sobre la inmunogenicidad de TUMAP desveladas en el presente documento, los inventores realizaron investigaciones usando un ensayo de cebado de linfocitos T *in vitro* basado en estimulaciones repetidas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De esta manera, los inventores pudieron demostrar inmunogenicidad para TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la divulgación, lo que demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales
- 25 existen linfocitos T precursores de CD8+ en seres humanos (Tabla 10).

Cebado *in vitro* de linfocitos T CD8+

- 30 Para realizar estimulaciones *in vitro* mediante células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, los inventores aislaron por primera vez linfocitos T CD8+ de productos frescos de leucofóresis HLA-A*02 mediante selección positiva usando microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de donantes sanos obtenidos de las clínicas universitarias de Mannheim, Alemania, después del consentimiento informado.

- 35 Las PBMC y los linfocitos CD8+ aislados se incubaron en medio de linfocitos T (TCM) hasta su uso consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con un 10 % de suero AB humano inactivado por calor (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), 100 U/ml Penicilina/100 µg/ml Estreptomycin (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), 20 µg/ml de Gentamicina (Cambrex), 2,5 ng/ml de IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Alemania) y 10 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma, Nürnberg, Alemania) también se
- 40 añadieron al TCM en esta etapa.

La generación de perlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de linfocitos T y lecturas se realizaron en

un sistema *in vitro* altamente definido que usa cuatro moléculas de pMHC diferentes por condición de estimulación y 8 moléculas de pMHC diferentes por condición de lectura.

El IgG2a de ratón coestimulador purificado anti-CD28 humano Ab 9.3 (Jung *et al.*, 1987) fue biotinilado químicamente usando Sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina según lo recomendado por el fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las perlas usadas fueron partículas de poliestireno recubiertas con estreptavidina de 5,6 µm de diámetro (Bangs Laboratories, Illinois, EE.UU.).

Los pMHC usados para las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 72) de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID NO 73), respectivamente.

Se recubrieron 800.000 perlas/200 µl en placas de 96 pocillos en presencia de $4 \times 12,5$ ng de biotina-pMHC diferentes, se lavaron y posteriormente se añadieron 600 ng de biotina anti-CD28 en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos co-incubando 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 perlas recubiertas lavadas en 200 µl de TCM suplementadas con 5 ng/ml de IL-12 (PromoCell) durante 3 días a 37°C. Después se intercambié la mitad del medio por TCM fresco suplementado con 80 U/ml de IL-2 y se continuó la incubación durante 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se realizó un total de tres veces. Para la lectura del multímero de pMHC usando 8 moléculas de pMHC diferentes por condición, se usó un enfoque de codificación combinatoria bidimensional como se describió anteriormente (Andersen *et al.*, 2012) con modificaciones menores que abarcan el acoplamiento a 5 fluorocromos diferentes. Finalmente, los análisis multiméricos se realizaron tiñendo las células con colorante IR cercano vivo/muerto (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), Clon de anticuerpo CD8-FITC SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis, se usó un citómetro BD LSRII SORP equipado con láseres y filtros adecuados. Las células específicas de péptidos se calcularon como porcentaje del total de células CD8+. La evaluación del análisis multimérico se realizó usando el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE.UU.). El cebado *in vitro* de linfocitos CD8+ multímeros+ específicos se detectó comparándolos con estimulaciones de control negativo. Se detectó inmunogenicidad para un antígeno determinado si al menos un antígeno evaluable *in vitro* Se descubrió que el pocillo estimulado de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (es decir, este pocillo contenía al menos 1 % de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas fue al menos 10x la mediana de las estimulaciones de control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* para péptidos de cáncer uterino

Para los péptidos HLA de clase I probados, la inmunogenicidad *in vitro* podría demostrarse mediante la generación de líneas de linfocitos T específicas de péptidos. En la Figura 3 se muestran los resultados ilustrativos de la citometría de flujo después de la tinción multimérica específica de TUMAP para dos péptidos, junto con los controles negativos correspondientes. En la Figura 4 se muestran resultados ilustrativos de citometría de flujo después de la tinción específica de multímero de TUMAP para tres péptidos junto con los controles negativos correspondientes. Los resultados de 7 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10A. Los resultados adicionales para 10 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10B.

Tabla 10A: inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I desvelados en el presente documento
Resultados ilustrativos de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* realizados por el solicitante para los péptidos desvelados en el presente documento. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Secuencia	pocillos
57	ALADLTGTVV	+
64	ALYDSVILL	+
58	GVLENIFGV	+
56	LLLEILHEI	+
59	QLLAGVFLA	+
62	SLWGQDVVL	++
69	VLTEFTREV	+

Tabla 10B: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I desvelados en el presente documento. Resultados ilustrativos de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* realizados por el solicitante para péptidos restringidos a HLA-A*02. Los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* están indicados. El porcentaje de pocillos y donantes positivos (entre los evaluables) se resume como se indica <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Secuencia	Pocillos positivos [%]
1	KLLDNLHDL	+
2	VLLDIFTGV	+++
3	GLDGATYTV	++++
6	SLLSELVEA	+
7	SILSLLIKL	++
9	SLYPGTETM	+
10	AILDVVVNL	+
14	FLVDSLISA	++
20	ALLGFVTDL	++
23	GLGPNLVGV	++++

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron usando una síntesis de péptidos en fase sólida convencional y bien establecida usando la estrategia Fmoc. La identidad y la pureza de cada péptido individual se determinaron mediante espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Los péptidos se obtuvieron como liofilizados blancos a blanquecinos (sal de trifluoroacetato) con purezas >50 %. Todos los TUMAP se administran preferentemente como sales de trifluoroacetato o sales de acetato, también son posibles otras formas de sal.

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para terapias basadas en células T se sometieron a pruebas adicionales para determinar su capacidad de unión al MHC (afinidad). Los complejos individuales péptido-MHC se produjeron mediante intercambio de ligando UV, donde un péptido sensible a los rayos UV se escinde mediante irradiación UV y se intercambia con el péptido de interés analizado. Solo los péptidos candidatos que pueden unirse y estabilizar eficazmente las moléculas MHC receptoras de péptidos previenen la disociación de los complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio, se realizó un ELISA basado en la detección de la cadena ligera ($\beta 2m$) de complejos MHC estabilizados. El ensayo se realizó como se describe generalmente en Rodenko *et al.* (Rodenko *et al.*, 2006).

Se recubrieron placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) durante la noche con 2 ug/ml de estreptavidina en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C en BSA al 2 % que contenía tampón de bloqueo. Los monómeros HLA-A*02:01/MLA-001 replegados sirvieron como patrones, cubriendo el intervalo de 15-500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio UV se diluyeron 100 veces en tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 ug/ml de anti- $\beta 2m$ conjugado con HRP durante 1 hora a 37 °C, se lavaron nuevamente y se detectaron con solución de TMB que se detuvo con NH_2SO_4 . La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que muestran un alto rendimiento de intercambio (preferentemente superior al 50 %, lo más preferido superior al 75 %) se prefieren generalmente para la generación y producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos, ya que muestran suficiente avidez por las moléculas del MHC y evitan la disociación de los complejos del MHC.

ES 3 005 964 T3

Tabla 11: Puntuaciones de unión del MHC de clase I. La unión de péptidos restringidos por HLA de clase I a HLA-A*02:01 se clasificó mediante el rendimiento del intercambio de péptidos: >10 % = +; >20 % = ++; >50 = +++; > 75 % = ++++

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptidos
1	KLLDNLHDL	++++
2	VLLDIFTGV	++++
3	GLDGATYTV	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEVRQI	++++
6	SLLSELVEA	++++
7	SILSLLIKL	++
8	SVMELLQGV	++++
9	SLYPGTETM	+++
10	AILDVVVNL	++++
11	ALDPPIHGL	++++
12	ALAPSEGVQAA	++++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	++++
15	GLLSVELRV	++++
16	KLNSSIQYV	+++
17	KLWEESTAQV	+++
19	YLETMNITL	+++
20	ALLGFVTDL	++++
21	VLGPEGQLV	+++
22	VLVSSVLGV	+++
23	GLGPNLVGV	++++
24	ILDAQTAFV	+++
25	ILLELFTHV	++++
26	SVLAGVVG	++++
27	VLNPETTVV	+++
28	GLDEAIRKV	+++
29	IGIGPVLNI	+
30	TLLDRVAVI	+++
31	ALLTAVTNV	+++
32	GLIENTYQL	+++
33	SMTTNLDLKV	++
34	AIAGRLLGV	++++
35	TLLPTLYEI	+++
36	SLLSDIHAL	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptidos
37	VLLATVTEL	+++
38	RILDIDIPLSV	+++
39	ALDGKIYEL	+++
40	GLLGGVIMMV	++++
41	YIDDIFSGV	++++
42	FLSGYYVTL	++++
43	VIANEIEKV	+++
44	FLNGLEILL	++++
45	VLLHVSVLL	++
46	NMDDVIYYV	+++
47	GLVEQLYDL	+++
48	ILAETQPEL	+++
49	ALLELLHEL	++++
50	TLSTVIATV	++++
51	TVPPVFSV	+++
52	ALISEKLETL	+++
53	VMHDSSFVS	++++
54	TLSDVVVGL	+++

Lista de referencias

- 5 Accardi, L. *et al.*, Int.J Cancer 134 (2014): 2742-2747
Allison, J. P. *et al.*, Science 270 (1995): 932-933
American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
An, Q. *et al.*, Haematologica 94 (2009): 1164-1169
Andersen, R. S. *et al.*, Nat.Protoc. 7 (2012): 891-902
10 Appay, V. *et al.*, Eur.J Immunol. 36 (2006): 1805-1814
Aung, C. S. *et al.*, Carcinogenesis 30 (2009): 1962-1969
Banchereau, J. *et al.*, Cell 106 (2001): 271-274
Beatty, G. *et al.*, J Immunol 166 (2001): 2276-2282
Beggs, J. D., Nature 275 (1978): 104-109
15 Benjamini, Y. *et al.*, Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995): 289-300
Boulter, J. M. *et al.*, Protein Eng 16 (2003): 707-711
Braumuller, H. *et al.*, Nature (2013)
Brossart, P. *et al.*, Blood 90 (1997): 1594-1599
Bruckdorfer, T. *et al.*, Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004): 29-43
20 Burger, H. *et al.*, Leukemia 8 (1994): 990-997
Card, K. F. *et al.*, Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 345-357
Chanock, S. J. *et al.*, Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-1223
Cheung, A. K. *et al.*, Oncotarget. 6 (2015): 13434-13447
Cheung, K. F. *et al.*, Cancer 118 (2012): 947-959
25 Cho, S. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 108 (2011): 20778-20783
Cohen, C. J. *et al.*, J Mol.Recognit. 16 (2003a): 324-332
Cohen, C. J. *et al.*, J Immunol. 170 (2003b): 4349-4361
Cohen, S. N. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972): 2110-2114
Cole, S. P. *et al.*, Science 258 (1992): 1650-1654
30 Coligan, J. E. *et al.*, Current Protocols in Protein Science (1995)
Colombetti, S. *et al.*, J Immunol. 176 (2006): 2730-2738
Coosemans, A. *et al.*, Anticancer Res 33 (2013): 5495-5500
Corral, R. *et al.*, PLoS.One. 8 (2013): e71211
Curry, M. C. *et al.*, J Biol Chem 287 (2012): 28598-28608

- Das, A. *et al.*, *Mol.Immunol.* 56 (2013): 113-122
 Dedes, K. J. *et al.*, *Sci.Transl.Med.* 2 (2010): 53ra75
 Della, Peruta M. *et al.*, *Cancer Res* 70 (2010): 8896-8906
 Deng, J. *et al.*, *Oncotarget* 5 (2014): 3173-3183
 5 Deng, J. *et al.*, *Br.J Surg.* 103 (2016): 407-416
 Dengjel, J. *et al.*, *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
 Denkberg, G. *et al.*, *J Immunol.* 171 (2003): 2197-2207
 Diaz-Griffero, F. *et al.*, *Virology* 378 (2008): 233-242
 Donnard, E. *et al.*, *Oncotarget* 5 (2014): 9199-9213
 10 Falk, K. *et al.*, *Nature* 351 (1991): 290-296
 Fang, Z. *et al.*, *J Biol Chem* 288 (2013): 7918-7929
 Follenzi, A. *et al.*, *Nat Genet.* 25 (2000): 217-222
 Fong, L. *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814
 Fukushima, Y. *et al.*, *Eur.J Cancer* 35 (1999): 935-938
 15 Gabrilovich, D. I. *et al.*, *Nat.Med* 2 (1996): 1096-1103
 Gao, Q. *et al.*, *Clin Cancer Res* (2016)
 Gattinoni, L. *et al.*, *Nat.Rev.Immunol.* 6 (2006): 383-393
 Gnjatic, S. *et al.*, *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
 Godkin, A. *et al.*, *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
 20 Green, J. *et al.*, *Cochrane.Database.Syst.Rev* (2005): CD002225
 Green, M. R. *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4^a (2012)
 Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* 2^a (2014)
 Gustafsson, C. *et al.*, *Trends Biotechnol.* 22 (2004): 346-353
 Hao, B. *et al.*, *Cancer Res* 64 (2004): 4378-4384
 25 Heubach, J. *et al.*, *Mol.Cancer* 14 (2015): 108
 Hollander, L. *et al.*, *Cancer Res* 76 (2016): 3884-3894
 Hung, C. F. *et al.*, *Immunol.Rev* 222 (2008): 43-69
 Hwang, M. L. *et al.*, *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
 Jain, S. *et al.*, *J Virol.* 89 (2015): 4449-4456
 30 Jaiswal, A. S. *et al.*, *Bioorg.Med.Chem Lett.* 24 (2014): 4850-4853
 Janoueix-Lerosey, I. *et al.*, *Oncogene* 23 (2004): 5912-5922
 Jung, G. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611-4615
 Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* rd (2000)
 Kim, N. *et al.*, *Genomics Inform.* 11 (2013): 239-244
 35 Krieg, A. M., *Nat.Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
 Krishnan, N. M. *et al.*, *Mol.Cancer Res* 14 (2016): 805-819
 Kuball, J. *et al.*, *Blood* 109 (2007): 2331-2338
 Laczmanska, I. *et al.*, *Acta Biochim.Pol.* 58 (2011): 467-470
 Landi, S. *et al.*, *Cancer Res* 66 (2006): 11062-11069
 40 Le, A. P. *et al.*, *Oncotarget* 6 (2015): 7293-7304
 Leitlinie Endometriumkarzinom, 032/034, (2008)
 Li, D. *et al.*, *Clin Cancer Res* 15 (2009): 740-746
 Li, J. *et al.*, *J Cell Mol.Med* 19 (2015): 2793-2805
 Li, Q. *et al.*, *J Gastroenterol.Hepatol.* 29 (2014): 835-842
 45 Liddy, N. *et al.*, *Nat.Med.* 18 (2012): 980-987
 Ljunggren, H. G. *et al.*, *J Exp.Med* 162 (1985): 1745-1759
 Longenecker, B. M. *et al.*, *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
 Lonsdale, J., *Nat.Genet.* 45 (2013): 580-585
 Lu, Y. *et al.*, *J Biol Chem* 287 (2012): 41014-41022
 50 Lukas, T. J. *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
 Lukka, H. *et al.*, *Clin Oncol (R Coil.Radiol.)* 14 (2002): 203-212
 Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* 3^a (2004)
 Ma, Z. *et al.*, *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8 (2015): 5071-5079
 Malik, M. F. *et al.*, *Histol.Histopathol.* 29 (2014): 151-165
 55 Mandell, M. A. *et al.*, *Dev.Cell* 30 (2014a): 394-409
 Mandell, M. A. *et al.*, *Autophagy.* 10 (2014b): 2387-2388
 Matsuo, M. *et al.*, *Biochem.Biophys.Res Commun.* 420 (2012): 901-906
 Mehrotra, M. *et al.*, *Leuk.Lymphoma* 55 (2014): 2538-2548
 Merry, C. *et al.*, *Cell Cycle* 9 (2010): 279-283
 60 Metzger, M. J. *et al.*, *J Virol.* 84 (2010): 1874-1880
 Meziere, C. *et al.*, *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
 Morgan, R. A. *et al.*, *Science* 314 (2006): 126-129
 Mori, M. *et al.*, *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
 Mortara, L. *et al.*, *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443
 65 Mueller, L. N. *et al.*, *J Proteome.Res.* 7 (2008): 51-61
 Mueller, L. N. *et al.*, *Proteomics.* 7 (2007): 3470-3480

- Mumberg, D. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999): 8633-8638
 Muvarak, N. *et al.*, Mol.Cancer Res 13 (2015): 699-712
 National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
 Nooter, K. *et al.*, Br.J Cancer 76 (1997): 486-493
 5 Norris, M. D. *et al.*, N.Engl.J Med. 334 (1996): 231-238
 Pawlica, P. *et al.*, J Gen.Virol. 96 (2015): 874-886
 Piasecka, D. *et al.*, Postepy Biochem. 61 (2015): 198-206
 Pinheiro, J. *et al.*, nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
 Plebanski, M. *et al.*, Eur.J Immunol 25 (1995): 1783-1787
 10 Porta, C. *et al.*, Virology 202 (1994): 949-955
 Rahim, S. *et al.*, PLoS.One. 9 (2014): e114260
 Rammensee, H. G. *et al.*, Immunogenetics 50 (1999): 213-219
 RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Capítulo 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
 Ribiczey, P. *et al.*, Biochem.Biophys.Res Commun. 464 (2015): 189-194
 15 Ribiczey, P. *et al.*, Cell Calcium 42 (2007): 590-605
 Richardson, M. W. *et al.*, Mol.Ther. 22 (2014): 1084-1095
 Rimkus, C. *et al.*, Clin Gastroenterol.Hepatol. 6 (2008): 53-61
 Rini, B. I. *et al.*, Cancer 107 (2006): 67-74
 Rock, K. L. *et al.*, Science 249 (1990): 918-921
 20 Rodenko, B. *et al.*, Nat.Protoc. 1 (2006): 1120-1132
 S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 032/033OL, (2014)
 Safarpour, D. *et al.*, Arch.Pathol.Lab Med. 139 (2015): 612-617
 Saiki, R. K. *et al.*, Science 239 (1988): 487-491
 Schmitt, T. M. *et al.*, Hum.Gene Ther. 20 (2009): 1240-1248
 25 Scholten, K. B. *et al.*, Clin Immunol. 119 (2006): 135-145
 Scholz, B. *et al.*, Dev.Cell 36 (2016): 79-93
 Seeger, F. H. *et al.*, Immunogenetics 49 (1999): 571-576
 SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
 Sharpe, D. J. *et al.*, Oncotarget. 5 (2014): 8803-8815
 30 Sherman, F. *et al.*, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
 Shu, S. T. *et al.*, Anticancer Res 30 (2010): 1937-1946
 Singh-Jasuja, H. *et al.*, Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004): 187-195
 Small, E. J. *et al.*, J Clin Oncol. 24 (2006): 3089-3094
 Srihari, S. *et al.*, Bioinformatics. 29 (2013): 1553-1561
 35 Stevanovic, S. *et al.*, J Clin Oncol 33 (2015): 1543-1550
 Sturm, M. *et al.*, BMC.Bioinformatics. 9 (2008): 163
 Sullivan, G. F. *et al.*, J Clin Invest 105 (2000): 1261-1267
 Tan, J. *et al.*, J Cell Physiol 228 (2013): 2305-2313
 Teufel, R. *et al.*, Cell Mol.Life Sci. 62 (2005): 1755-1762
 40 Tran, E. *et al.*, Science 344 (2014): 641-645
 Udali, S. *et al.*, Clin Epigenetics. 7 (2015): 43
 Vanaja, D. K. *et al.*, Clin Cancer Res 12 (2006): 1128-1136
 Vardhini, N. V. *et al.*, Tumour.Biol 35 (2014): 10855-10860
 Varga, K. *et al.*, Cell Calcium 55 (2014): 78-92
 45 Vici, P. *et al.*, J Exp.Clin Cancer Res 33 (2014): 29
 Walter, S. *et al.*, J.Immunol. 171 (2003): 4974-4978
 Walter, S. *et al.*, Nat Med. 18 (2012): 1254-1261
 Wang, N. *et al.*, Arch. Gynecol. Obstet. 283 (2011): 103-108
 Wang, Y. Y. *et al.*, World J Surg.Oncol 13 (2015): 259
 50 Willcox, B. E. *et al.*, Protein Sci. 8 (1999): 2418-2423
 Wilting, S. M. *et al.*, Genes Chromosomes. Cancer 47 (2008): 890-905
 World Cancer Report, (2014)
 Yang, H. *et al.*, Oncol Rep. 34 (2015a): 1681-1691
 Yang, Q. *et al.*, Oncotarget. 6 (2015b): 3268-3279
 55 Ye, S. M. *et al.*, Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi. 92 (2012): 1954-1958
 Zaremba, S. *et al.*, Cancer Res. 57 (1997): 4570-4577
 Zhang, L. *et al.*, J Exp.Clin Cancer Res 28 (2009a): 78
 Zhang, Y. W. *et al.*, Mol.Cell 35 (2009b): 442-453
 Zufferey, R. *et al.*, J Virol. 73 (1999): 2886-2892

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12; un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 y 1 aminoácido adicional unido a los extremos N-terminal y/o C-terminal del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.
3. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión con aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (li).
4. Un receptor de células T recombinante, soluble o unido a la membrana que es reactivo con un ligando HLA, en donde dicho ligando consiste en un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un anticuerpo, soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 cuando se une a una molécula MHC.
7. Un ácido nucleico, que codifica un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un TCR de acuerdo con la reivindicación 4, o un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.
8. Una célula hospedadora recombinante que comprende el péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Un método para producir el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o para producir el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 4, o un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 8 que presenta el péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, o expresa el ácido nucleico o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, y aislar el péptido o el TCR o el anticuerpo de la célula hospedadora o su medio de cultivo.
10. Un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el método poner en contacto *in vitro* linfocitos T con moléculas del MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada o una construcción artificial que imita una célula presentadora de antígenos durante un período de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de una manera específica para el antígeno, en donde dicho antígeno es un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
11. Un linfocito T activado, producido por el método de acuerdo con la reivindicación 10 que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1.
12. Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, la célula de acuerdo con la reivindicación 8, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 11 o el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6 o el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, la célula de acuerdo con la reivindicación 8, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 11 o el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6 o el receptor de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde dicho cáncer es cáncer uterino.
14. Uso del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 en el diagnóstico *in vitro* de cáncer uterino.
15. Un kit que comprende:
 - a) un recipiente que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, la célula de acuerdo con la reivindicación 8, el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 11 o el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6 o el receptor de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 4, en solución o en forma liofilizada; y
 - b) un segundo recipiente que contiene un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada.

Figura 1A
Péptido: RLDIQGTGQLL (A*02)
SEQ ID NO: 4

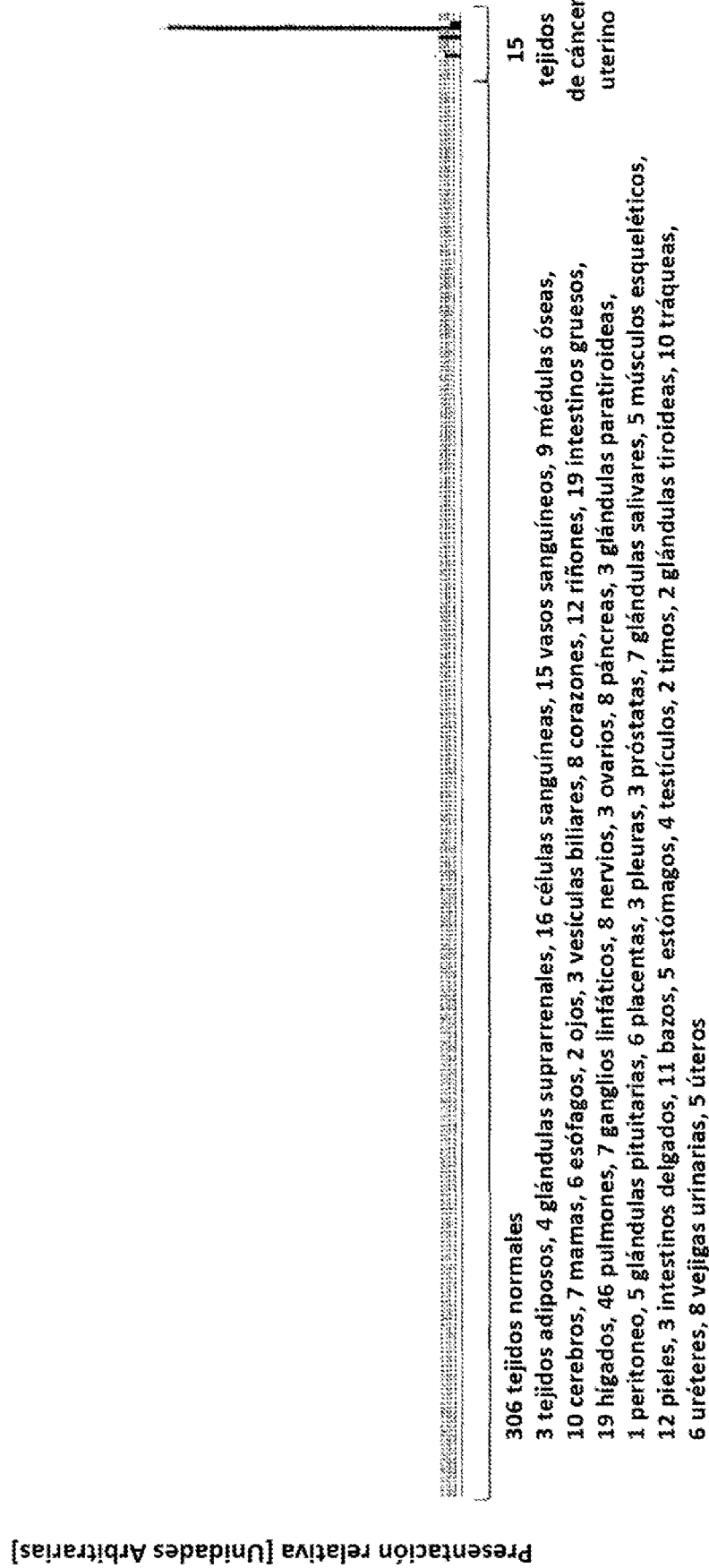


Figura 1B

Péptido: SLFDEVQRQI (A*02)

SEQ ID NO: 5

Presentación relativa [Unidades Arbitrarias]

237

306 tejidos normales	15
3 tejidos adiposos, 4 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas,	tejidos
10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 8 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos,	de cáncer
19 hígados, 46 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroideas,	uterino
1 peritoneo, 5 glándulas pituitarias, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivares, 5 músculos esqueléticos,	
12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazo, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroideas, 10 tráqueas,	
6 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros	

Figura 1C
Péptido: VLLDIFTGV (A*02)
SEQ ID NO: 2

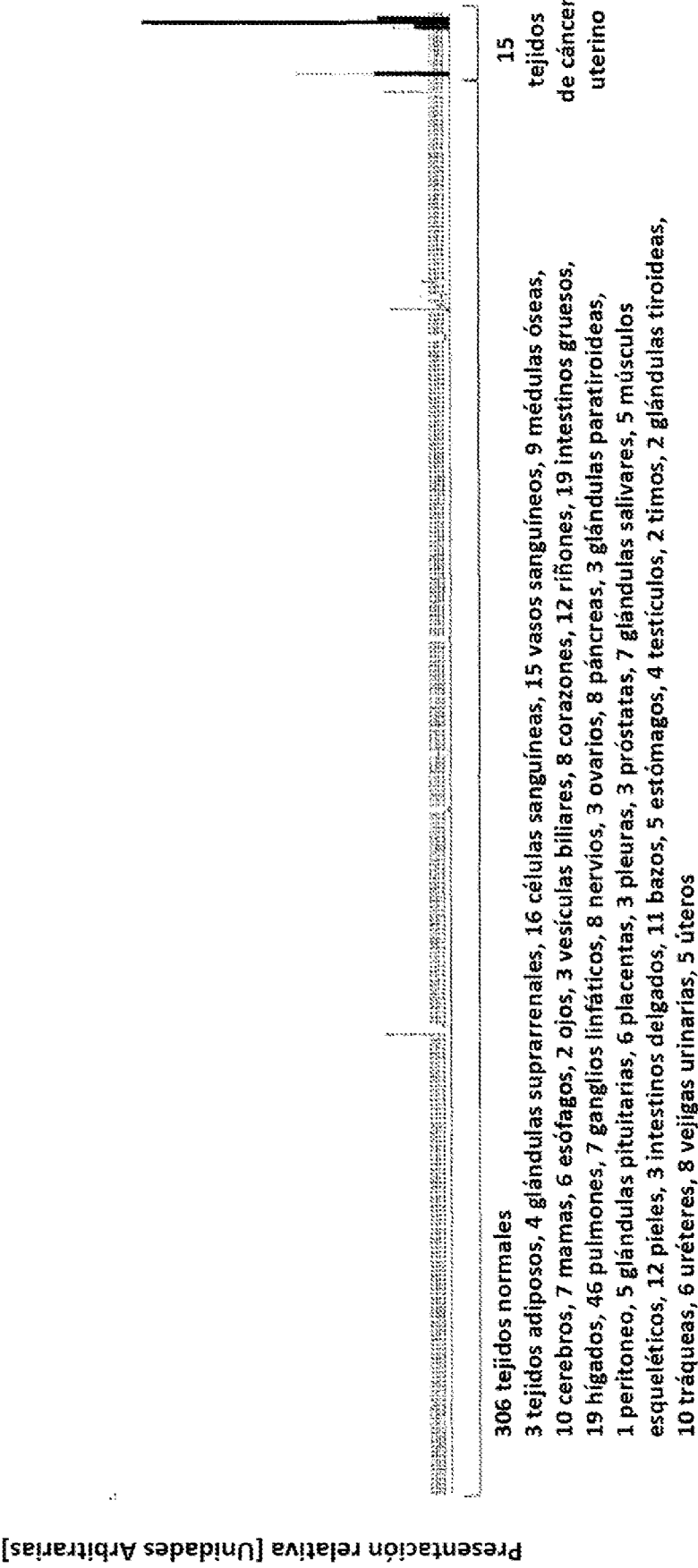
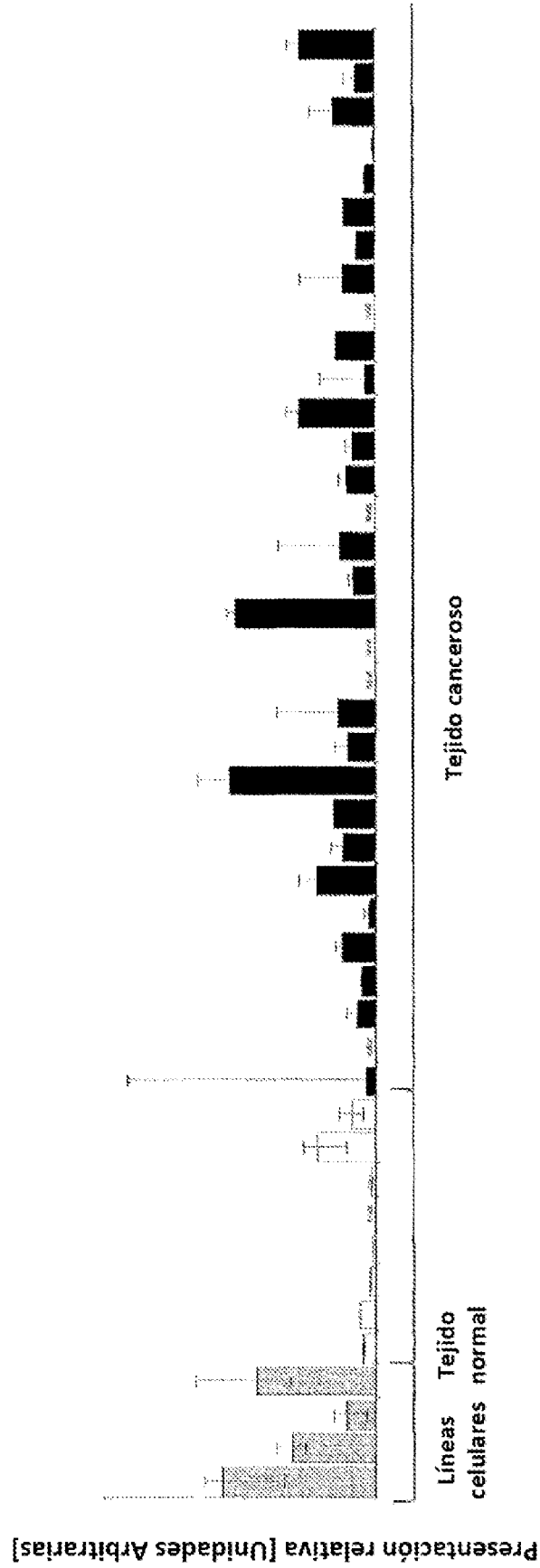


Figura 1D
 Péptido: GLDGATYTV (A*02)
 SEQ ID NO: 3



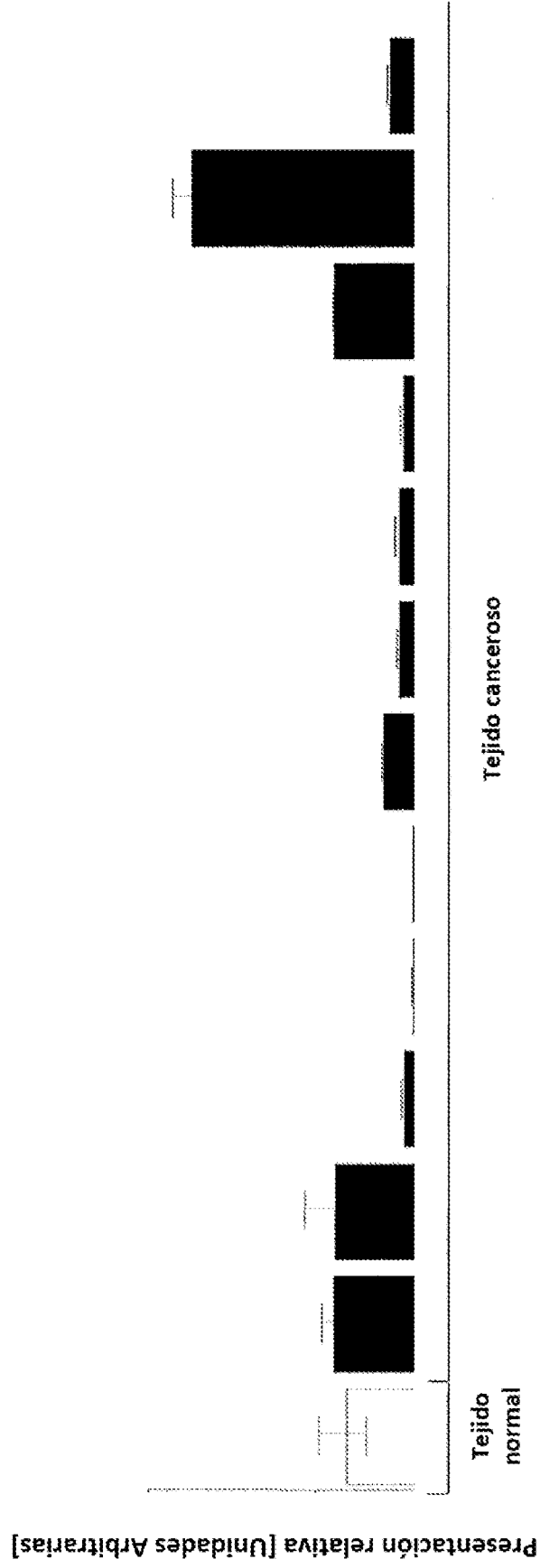
Péptido detectado en
 3 líneas celulares (1 de células sanguíneas, 1 pancreática, 1 de piel), 2 tejidos normales (1 placenta, 1 útero), 20 tejidos de cáncer (1 cáncer de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 1 cáncer de hígado, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ganglio linfático, 2 cánceres de próstata, 3 melanomas, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres uterinos) (de izquierda a derecha)

Figura 1E
 Péptido: SVMELLQGV (A*02)
 SEQ ID NO: 8



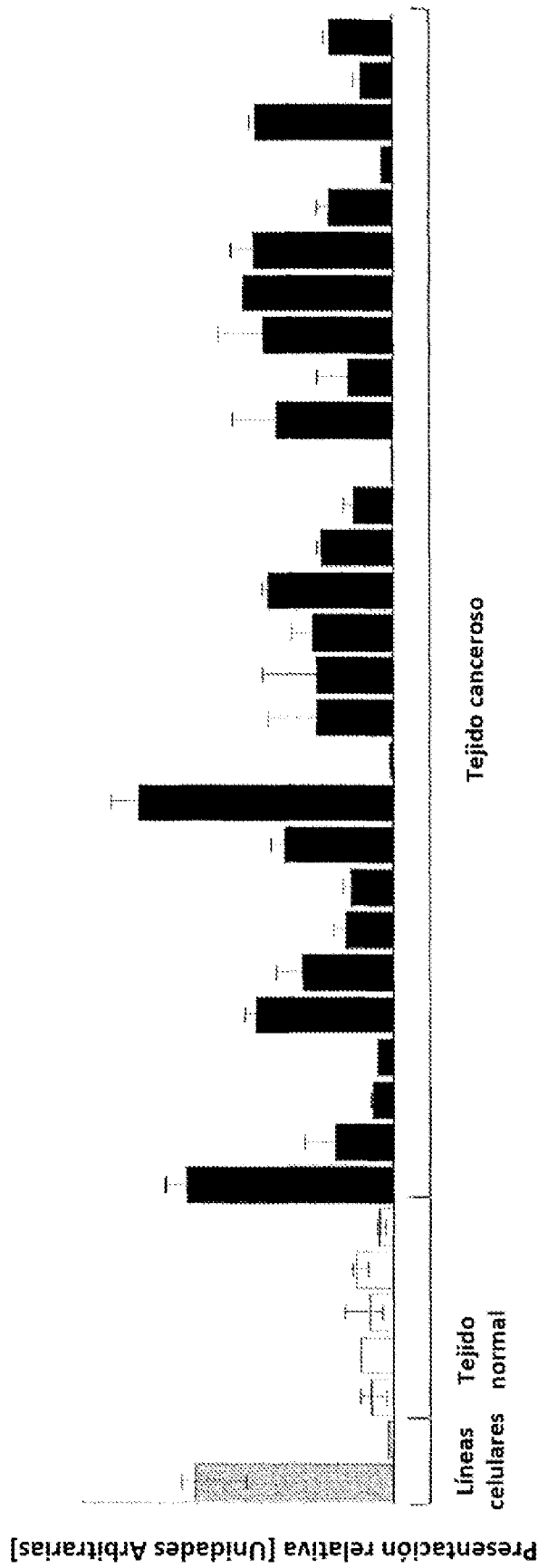
Péptido detectado en
 4 líneas celulares (4 linfocitos), 8 tejidos normales (1 riñón, 1 hígado, 1 placenta, 1 próstata, 1 intestino delgado, 1 glándula tiroidea, 2 úteros), 32 tejidos de cáncer (3 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de próstata, 1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de colon, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 3 cánceres de hígado, 5 cánceres de cabeza y cuello, 3 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 6 cánceres de pulmón, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1F
Péptido: VLGPEGQLV (A*02)
SEQ ID NO: 21



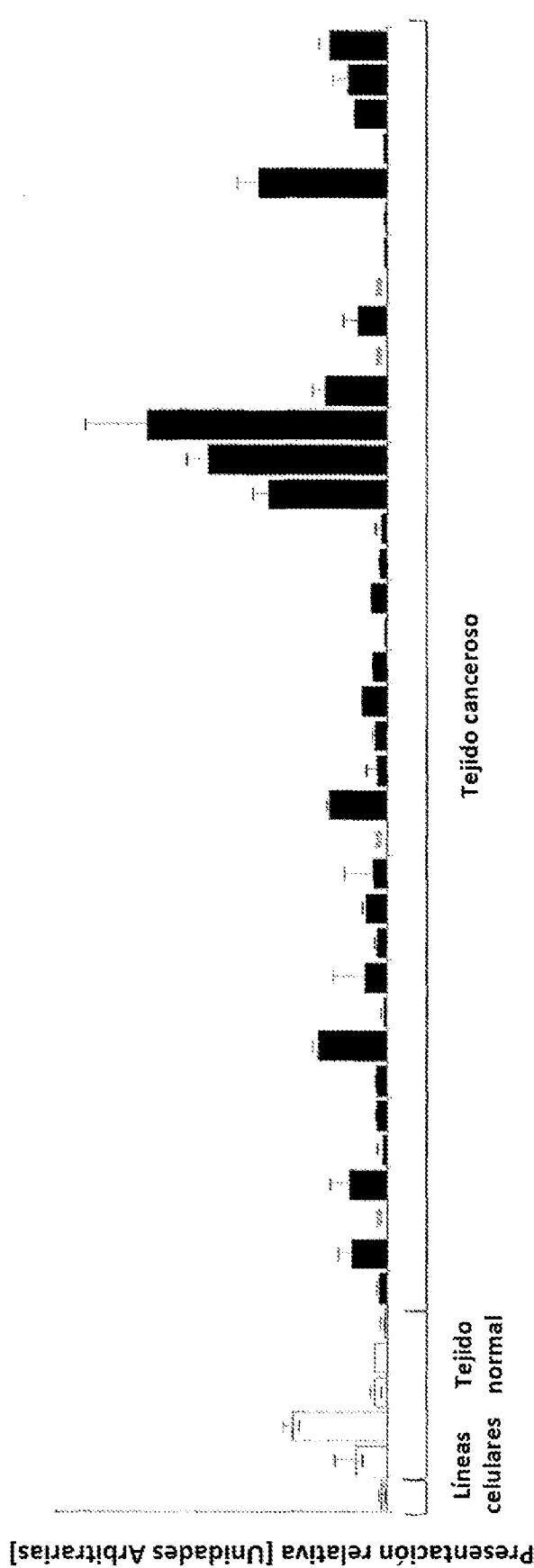
Péptido detectado en
1 tejido normal (1 tráquea), 12 tejidos de cáncer (1 cáncer de próstata, 2 cánceres de mama, 2 cánceres de los ganglios linfáticos,
1 cáncer de pulmón, 6 cánceres uterinos) (de izquierda a derecha)

Figura 1G
 Péptido: TLLDRVAVI (A*02)
 SEQ ID NO: 30



Péptido detectado en
 2 líneas celulares (1 leucocito, 1 riñón), 5 tejidos normales (1 colon, 1 hígado, 1 ganglio linfático, 1 intestino delgado, 1 bazo),
 27 tejidos de cáncer (1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de mama, 3 cánceres de leucemia leucocítica, 1 cáncer de colon,
 1 cáncer de recto, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 2 cánceres de hígado, 1 cáncer de cabeza y cuello,
 4 cánceres de los ganglios linfáticos, 2 cánceres ováricos, 1 cáncer de cerebro, 3 cánceres pulmonares, 1 cáncer de riñón,
 1 cáncer de vejiga urinaria, 2 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

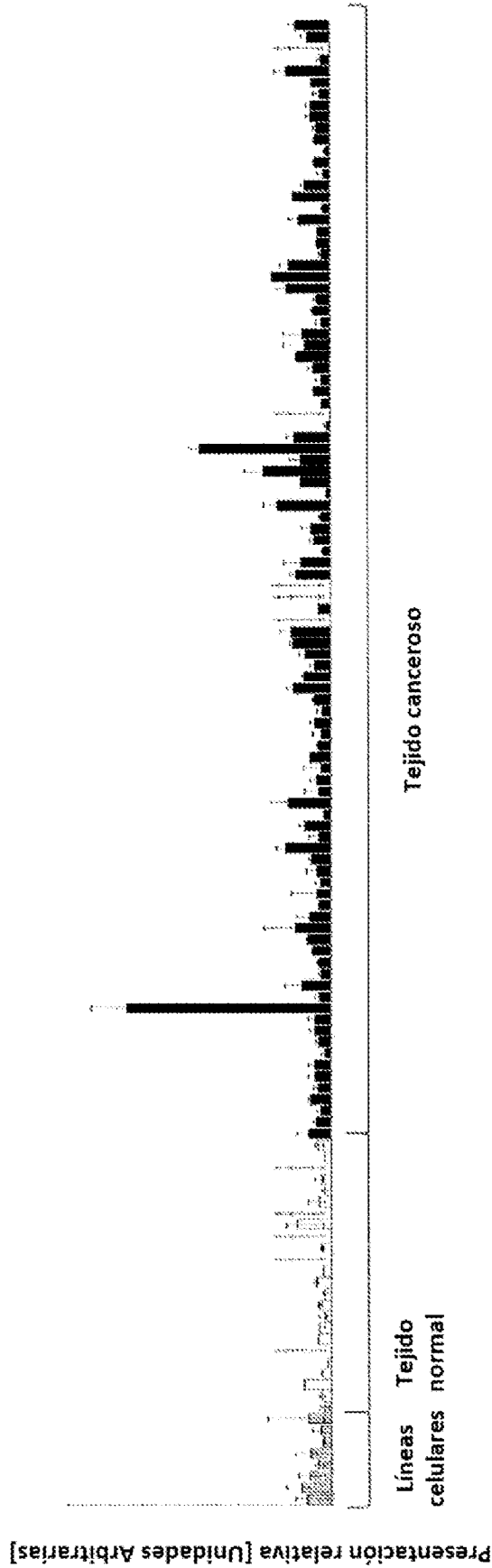
Figura 1H
Péptido: NMDDVIYV (A*02)
SEQ ID NO: 46



Péptido detectado en

1 línea celular (1 páncreas), 5 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales, 1 bazo, 2 tráqueas), 37 tejidos de cáncer (3 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de próstata, 1 cáncer de colon, 1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de hígado, 3 cánceres de cabeza y cuello, 4 cánceres de piel, 4 cánceres de los ganglios linfáticos, 2 cánceres ováricos, 1 cáncer de páncreas, 2 cánceres de estómago, 5 cánceres pulmonares, 2 cánceres de vejiga urinaria, 4 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1f



8 líneas celulares (1 vejiga urinaria, 1 linfocito, 1 leucocito, 1 piel, 2 próstatas, 2 páncreas), 24 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales, 1 esófago, 1 ojo, 1 cabeza y cuello, 1 riñón, 1 recto, 2 pulmones, 2 ganglios linfáticos, 1 páncreas, 1 peritoneo, 4 placentas, 1 próstata, 2 intestinos delgados, 2 glándulas tiroideas, 2 úteros), 98 tejidos de cáncer (3 cánceres de leucemia linfocítica, 6 cánceres de próstata, 4 cánceres de mama, 1 cáncer colorrectal, 1 cáncer de colon, 3 cánceres de recto, 1 cáncer del conducto biliar, 2 cánceres de vesícula biliar, 3 cánceres de hígado, 4 cánceres de cabeza y cuello, 5 cánceres de piel, 5 cánceres del ganglio linfático, 4 cánceres ováricos, 5 cánceres esofágicos, 2 cánceres de páncreas, 11 cánceres de cerebro, 25 cánceres de pulmón, 1 cáncer de riñón, 7 cánceres de vejiga urinaria, 5 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 2A

Gen: MSX1

Péptido: ALAPSEGVQAA

SEQ ID NO: 12

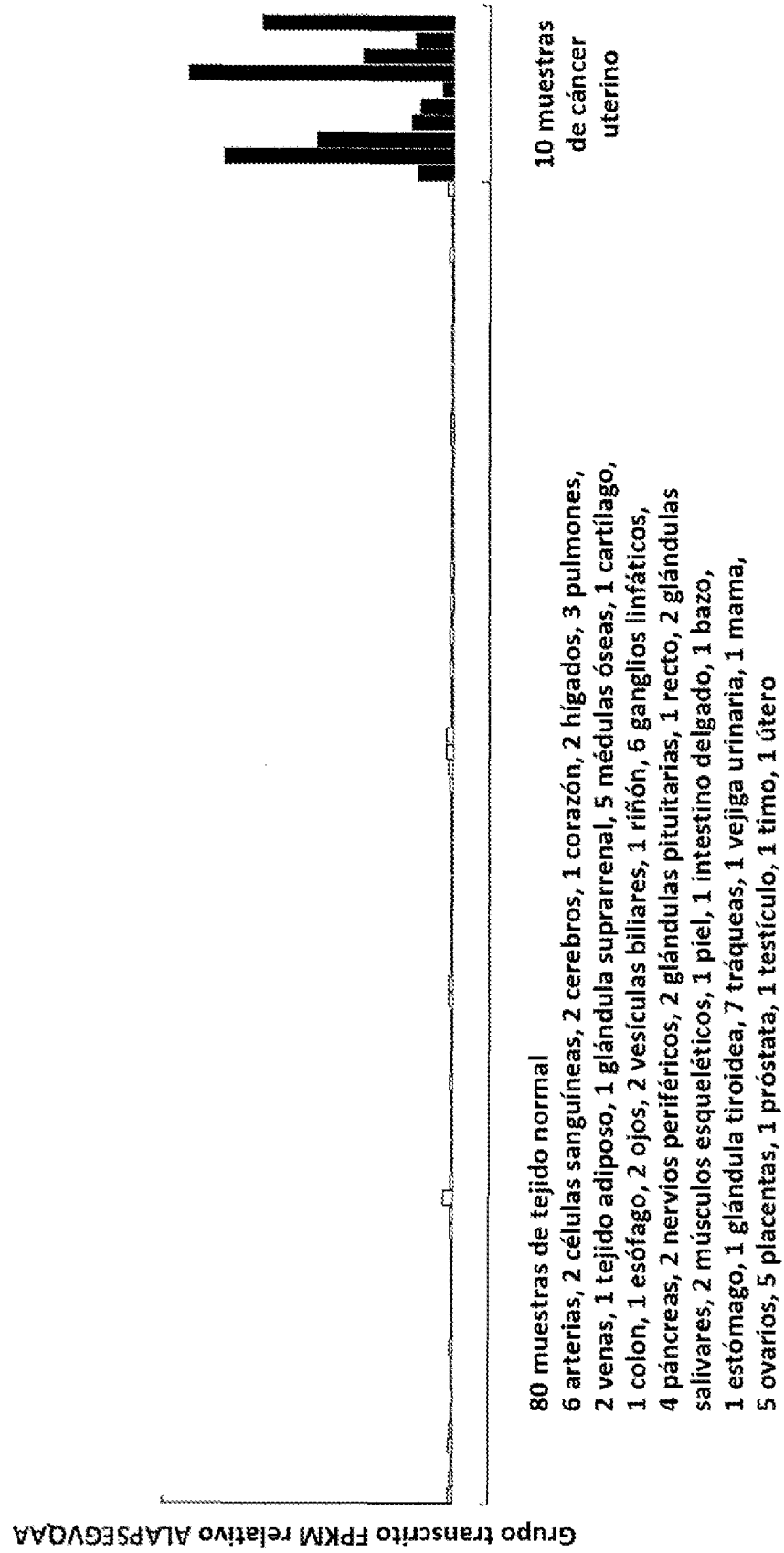


Figura 2B
Gen: NXNL2
Péptido: ALQNKVVAL
SEQ ID NO: 13

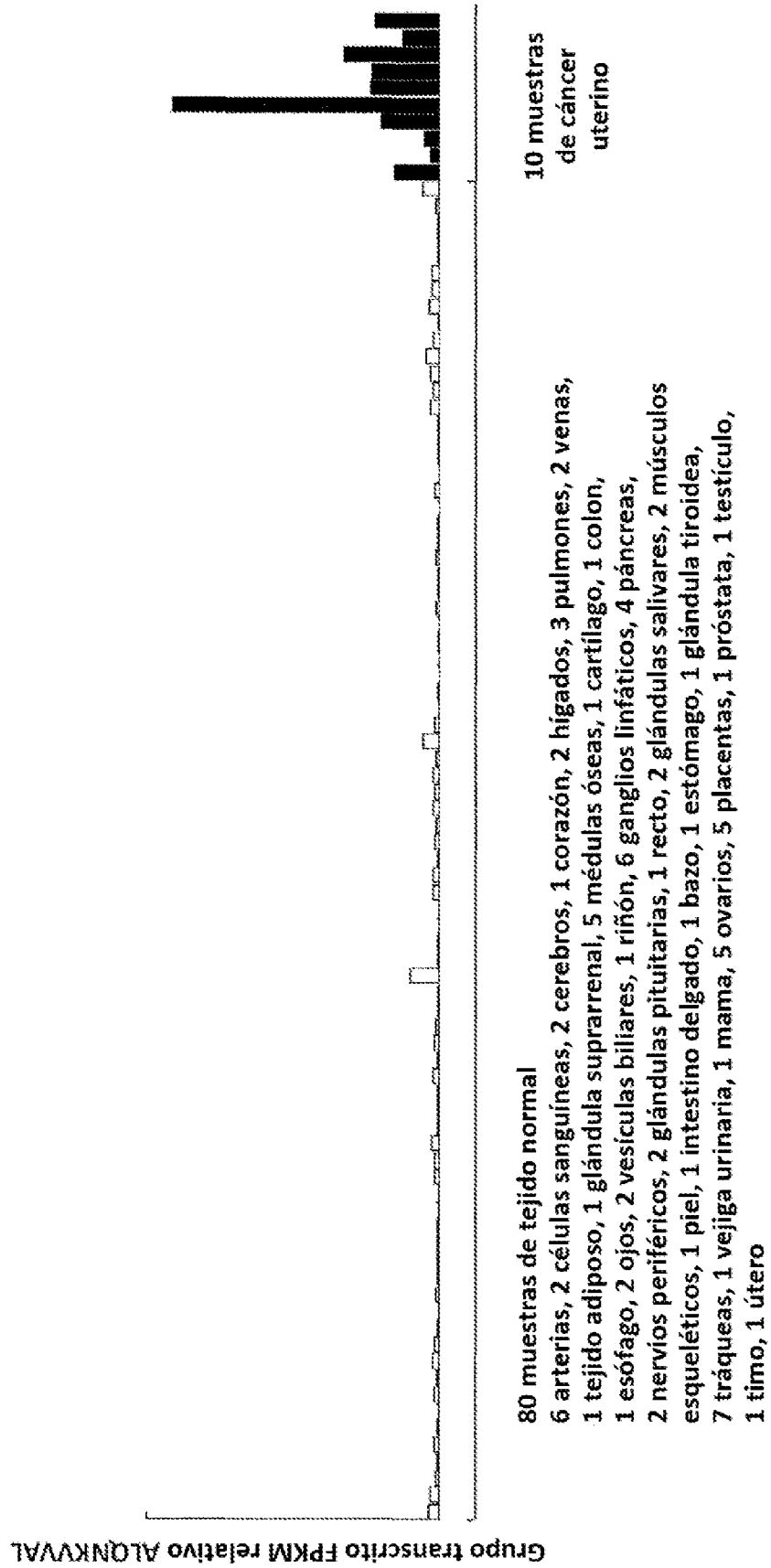


Figura 2C
 Gen: TMEM101
 Péptido: FLSGYVVT
 SEQ ID NO: 42

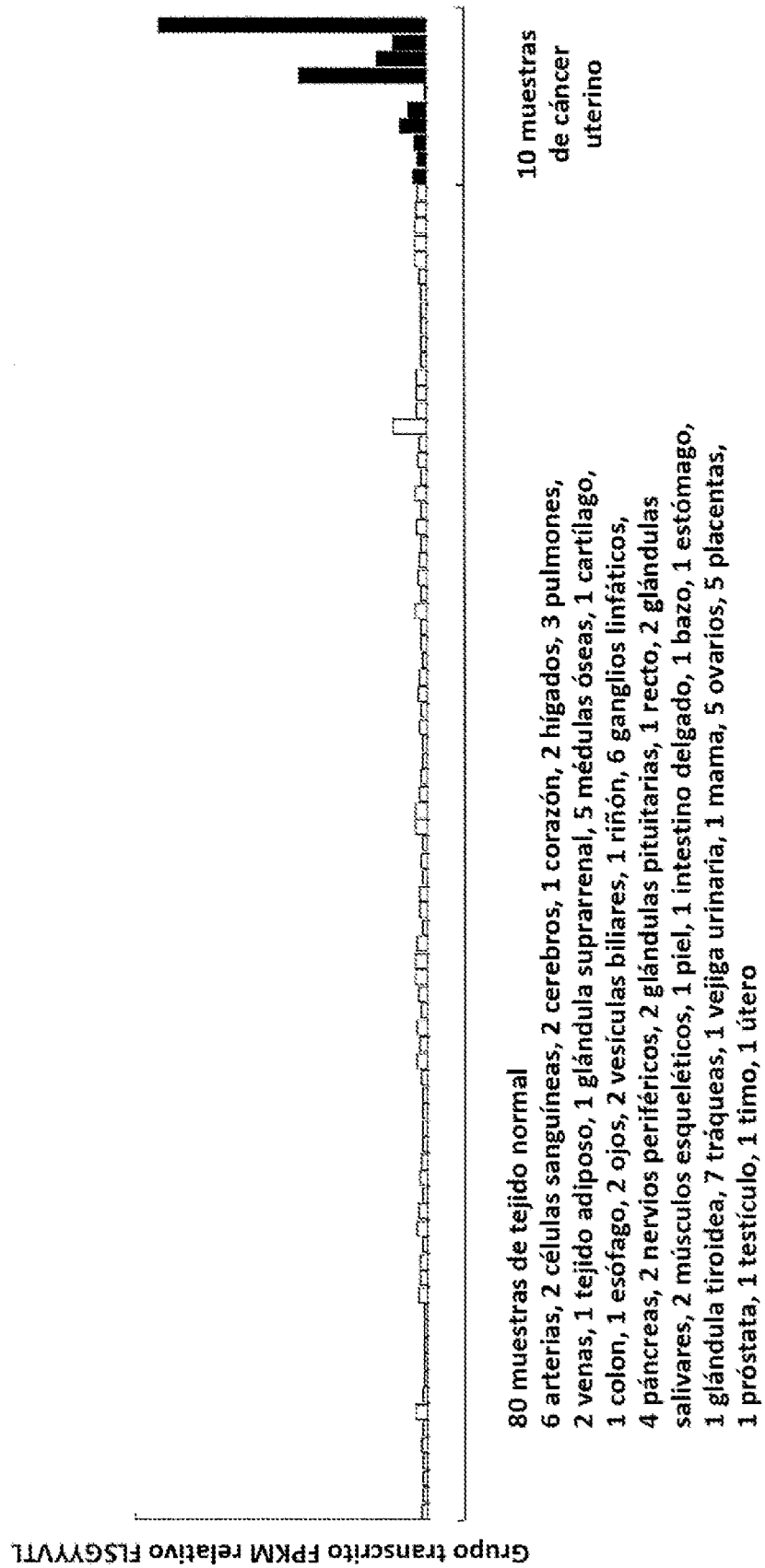


Figura 2D

Gen: STX18

Péptido: ILAETQPEL

SEQ ID NO: 48

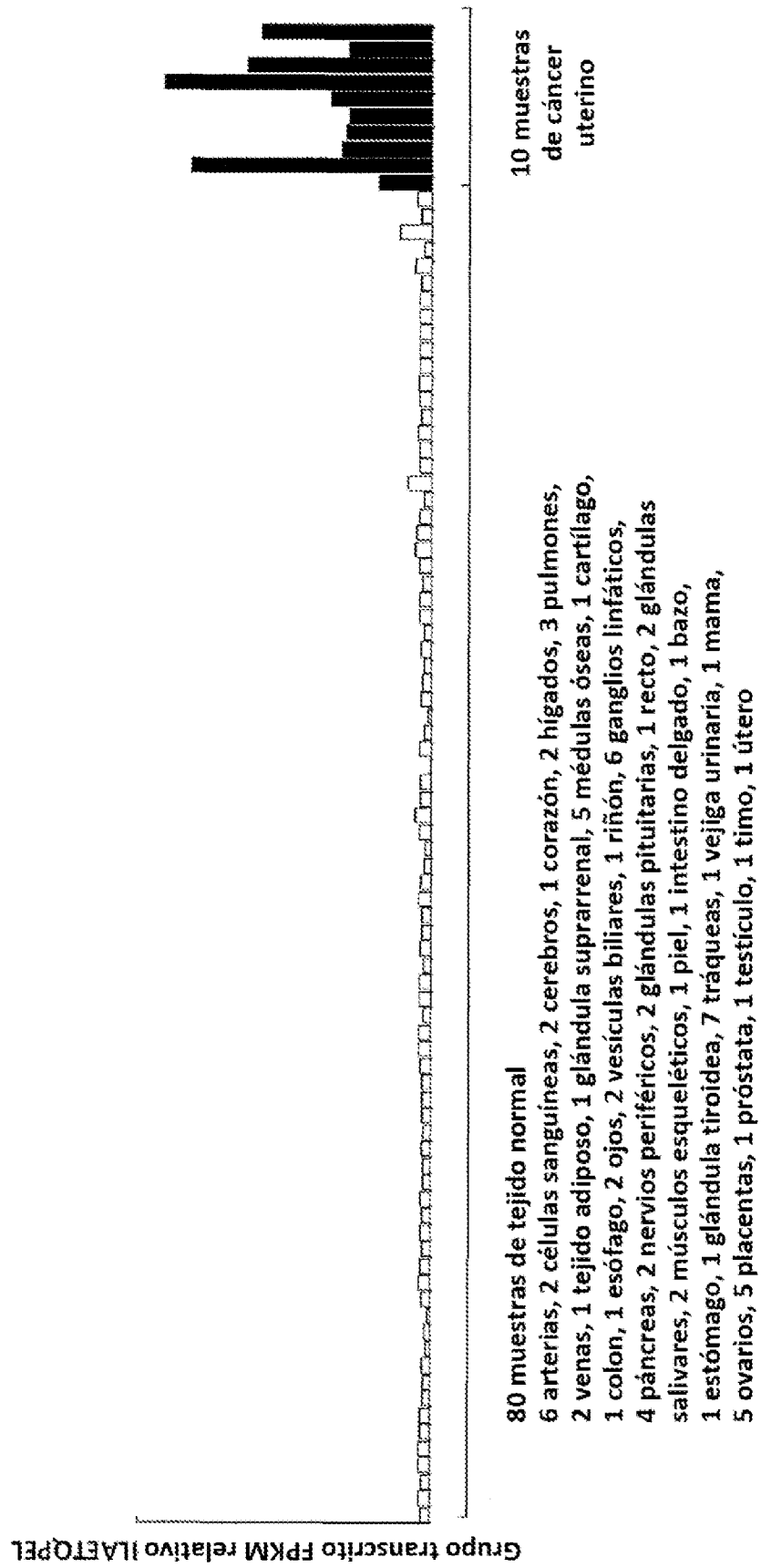


Figura 3

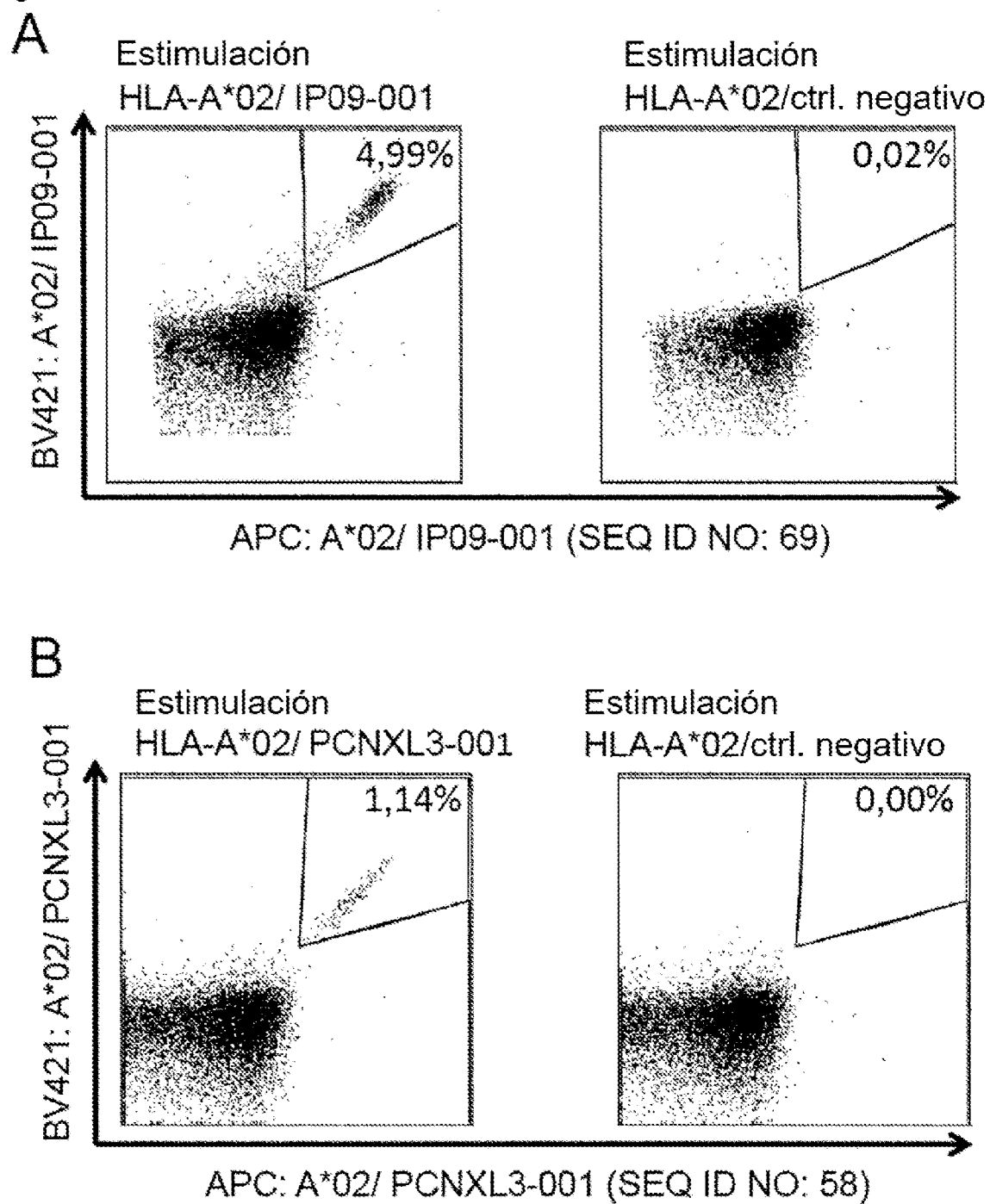


Figura 4

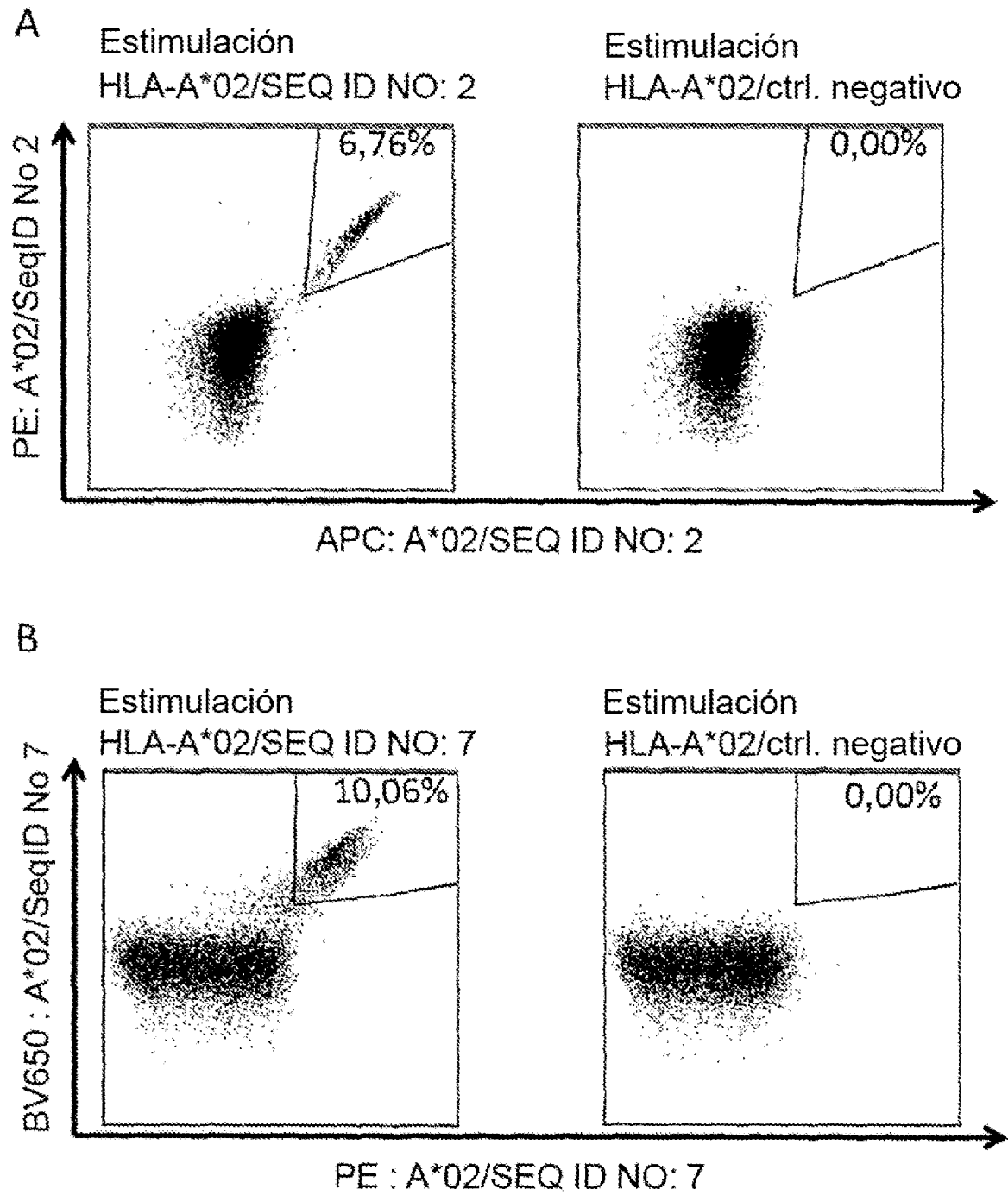


Figura 4 (continuación)

