(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 992 110**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 20179380 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3753570**

(54) Título: **Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer gastrointestinal y gástrico**

(30) Prioridad:

19.03.2010 US 31570410 P
19.03.2010 GB 201004551

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

WEINSCHENK, TONI;
FRITSCHE, JENS;
WALTER, STEFFEN;
LEWANDROWSKI, PETER y
SINGH, HARPREET

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer gastrointestinal y gástrico

La presente invención se refiere generalmente al campo de los péptidos, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. Por lo tanto, la presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia contra el cáncer. En general, la presente invención se refiere asimismo a epítopos peptídicos asociados a tumores reconocidos por linfocitos T CD8+, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales. En la presente memoria se dan a conocer secuencias de 33 péptidos y sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I de células tumorales humanas que pueden usarse en composiciones de vacunas para suscitar respuestas inmunitarias antitumorales, particularmente respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Antecedentes de la invención

El cáncer gástrico es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de células tumorales malignas en la mucosa que recubre el estómago. El cáncer de estómago o gástrico puede aparecer en cualquier parte del estómago y extenderse por todo él y a otros órganos, sobre todo al esófago, a los pulmones y al hígado. El cáncer de estómago es el cuarto cáncer más frecuente en el mundo con 930. 000 casos diagnosticados en 2002. Es una enfermedad con una elevada tasa de mortalidad (~800.000 al año) que la convierte en la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, solo superada por el cáncer de pulmón. Afecta con más frecuencia a los varones y sobre todo a los habitantes de los países asiáticos y de países en vías de desarrollo. (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.)

En Estados Unidos representa aproximadamente el 2% (25. 500 casos) de los casos nuevos de cáncer cada año, pero es más frecuente en otros países. En Corea es el cáncer más importante, con el 20,8% de las neoplasias malignas. En Japón el cáncer gástrico sigue siendo el cáncer más común en la población masculina. Cada año en Estados Unidos se diagnostica cáncer de estómago a unos 13. 000 hombres y 8. 000 mujeres. La mayoría tienen más de 70 años.

El cáncer de estómago es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en el mundo, por detrás delcáncer de pulmón, mama, colon y recto. Además, sigue siendo la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer. La *American Cancer Society* calcula que en 2007 se produjeron un millón de casos nuevos, cerca del 70% en países en vías de desarrollo, y unos 800.000 fallecimientos (http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2. pdf.)

La incidencia de la enfermedad presenta una enorme variación geográfica en el globo. La incidencia es máxima en Asia y en regiones de Sudamérica, y mínima en Norteamérica. La mortalidad más elevada se registra en Chile, Japón, Sudamérica y la antigua Unión Soviética.

El cáncer gástrico se diagnostica a menudo en un estadio avanzado debido a la inexistencia de campañas de cribado en la mayor parte del mundo, excepto en Japón (y, de forma limitada, en Corea) donde la detección precoz es un hecho frecuente. Así pues, supone un desafío importante para los profesionales sanitarios. Los factores de riesgo del cáncer gástrico son la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), el tabaquismo, la abundante ingesta de sal y otros factores alimenticios. Una pequeña parte de los casos de cáncer gástrico (1% a 3%) está vinculada a síndromes de predisposición genética. Las mutaciones de la cadherina E están presentes en cerca del 25% de las familias con predisposición a la dominancia autosómica del cáncer gástrico de tipo difuso. Este subgrupo de tumores gástricos ha sido denominado cáncer gástrico difuso hereditario. Puede ser útil ofrecer consejo genético y considerar la gastrectomía profiláctica en portadores jóvenes asintomáticos de truncadoras en la línea germinal.

La pared del estómago está compuesta por tres capas de tejido: la mucosa (interna), la capa muscular (media) y la capa serosa (externa). El cáncer gástrico comienza en las células que recubren la mucosa y se extiende hasta las capas externas a medida que crece. Cuatro son los tipos de tratamiento estándar. El tratamiento del cáncer gástrico puede consistir en cirugía, quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia. La cirugía es el tratamiento primario contra el cáncer gástrico. El objetivo es lograr la resección completa con márgenes negativos (resección R0). Sin embargo, cerca del 50% de los pacientes con cáncer gástrico locorregional no son aptos para la resección R0. R1 indica cáncer residual microscópico (márgenes positivos); y R2 cáncer residual macroscópico pero sin metástasis. El desenlace del paciente depende del estadio del cáncer en el momento del diagnóstico (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™).

La supervivencia a 5 años tras la resección con finalidad curativa se sitúa entre el 30% y el 50% en los pacientes con estadio II y entre el 10% y el 25% en los pacientes con estadio III. Estos pacientes tienen un alto riesgo de recidiva local y sistémica. La metástasis aparece en el 80-90% de los individuos con cáncer de estómago, con una tasa de supervivencia a seis meses del 65% en los diagnosticados en estadios iniciales y de menos del 15% en los diagnosticados en estadios avanzados.

En definitiva, sigue existiendo la necesidad de nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras que mejoren el bienestar prescindiendo del uso de antineoplásicos y otros agentes que pueden causar efectos secundarios graves

para los pacientes con cáncer gástrico, el carcinoma prostático, carcinomas de la cavidad bucal, carcinoma escamoso oral (OSCC), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma MALT inducido por *H. pylori*, carcinoma de colon/cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cánceres de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, tumores cerebrales de diverso fenotipo, leucemias como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer de pulmón, sarcoma de Ewing, cáncer de endometrio, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer epitelial de la laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas ováricos, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales, carcinoma de los conductos salivales, cáncer de cuello de útero, linfomas de linfocitos T/NK extraganglionares, linfoma no hodgkiniano y tumores sólidos malignos del pulmón y la mama, y otros tumores.

La hoja informativa de Immatics Company (https://immatics.com/?action=download&id=421) da a conocer que el titular de la patente desarrolla agentes inmunoterapéuticos y utiliza, entre otros, la tecnología XPRESIDENT™. BhioRegio Stem (https://www.bioregio-stern.de/de/Aktuelles/details_nachrichten.php?OF_ID=4169) da a conocer que el titular de la patente ha presentado una nueva versión de la plataforma tecnológica XPRESIDENT™. Wordpress daba a conocer el 17 de febrero de 2010 que se iba a llevar a cabo un ensayo de fase I utilizando una vacuna contra el cáncer del titular de la patente (https://silico.wordpress.com/2010/02/17/immatics-signs-collaboration-agreement-with-cancer-research-ulc/). El documento EP 2 172 211 A1 se refiere a péptidos inmunoterapéuticos y a su uso en la inmunoterapia del cáncer. Un comunicado de prensa del 17 de junio de 2009 da a conocer la finalización de una nueva generación de la plataforma XPRESIDENT™ (http://www.immatics.com/index.php?page=76&modaction=detail&modid=213&modid2=2009).

En presente invención se dan a conocer péptidos que estimulan el sistema inmunitario del paciente y actúan como agentes antitumorales no invasivos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6, así como a un vector de expresión que contiene este ácido nucleico. La presente invención se refiere además al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6, o un ácido nucleico que codifica este péptido, o un vector de expresión que comprende este ácido nucleico para su uso en medicina. La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6, o un vector de expresión que comprende este ácido nucleico.

La presente invención se refiere además a un método para producir el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6. El método comprende cultivar la célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6, o un vector de expresión que comprende este ácido nucleico. El método comprende además aislar el péptido de la célula hospedadora o su medio de cultivo.

La presente invención se refiere además a un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados. El método comprende poner en contacto CTL *in vitro* con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica para el antígeno. El antígeno es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención también se refiere a un linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido mediante el método anterior. El CTL activado reconoce selectivamente una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención se refiere además al linfocito T citotóxico descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de células cancerosas en un paciente. Estas células cancerosas presentan un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención se refiere además al péptido que consiste en la secuencia conforme a la SEQ ID N.º: 6, el ácido nucleico o el vector de expresión como se ha definido anteriormente, la célula hospedadora como se ha definido anteriormente o el linfocito T citotóxico activado como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención también se refiere al uso no terapéutico del péptido que consiste en la secuencia conforme a la SEQ ID N.º: 6 para la generación y desarrollo de anticuerpos que son específicos contra un complejo MHC/péptido que comprende este péptido.

La presente invención se refiere además a un anticuerpo que se une específicamente a un complejo MHC/péptido que

comprende el péptido que consiste en la secuencia conforme a la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención se refiere además a un receptor de linfocitos T que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6 en complejo con una molécula de MHC de clase I, para su uso como medicamento o para su uso en medicina.

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos ($TCD8^+$) en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en dicha respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: moléculas del MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). La conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRIPS y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II se hallan mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas. Presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC en el curso de la endocitosis y después son procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

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

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

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

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

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

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

c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es

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

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

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

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

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no solo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo, porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a tumores también pueden ser dianas en una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar solo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ejemplo de espectro de masas de CDC2-001 que demuestra su presentación en la muestra GC2464 de tumor primario. Se llevó a cabo una cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con nanoESI con una mezcla de péptidos eluida de la muestra de CG número 2464. El cromatograma de masas de m/z 597,3501 ± 0,001 Da, z = 2 muestra un pico de péptido en el tiempo de retención 151,63 min. B) El pico detectado en el cromatograma de masas a los 151,63 min reveló una señal de m/z 597,3501 en el espectro de EM. C) El espectro de masas resultante de la desintegración inducida por colisiones del precursor seleccionado m/z 597,3501 registrado en el experimento de CL-EM con nanoESI en el tiempo de retención indicado confirmó la presencia de CDC2-001 en la muestra de tumor GC2464. D) Para verificar la secuencia se registró el patrón de fragmentación del péptido de referencia sintético CDC2-001 y se comparó con el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural mostrado en C.

Figura 2: Perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en muestras de tejidos normales y en 25 muestras de cáncer gástrico

a) CDC2 (Probeset ID: 203213_at)
b) ASPM (Probeset ID: 219918_s_at)

Figura 3: Ejemplos de resultados de la inmunogenicidad *in vitro* específica de péptido de TUMAP de clase I. Los linfocitos T CD8+ fueron sensibilizados con APC artificiales cargadas con un péptido relevante (recuadro izquierdo) y otro irrelevante (recuadro derecho), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción doble con multímeros A*2402 relevantes e irrelevantes. Las células mostradas están seleccionadas entre linfocitos CD8+ vivos y las cifras que aparecen en las gráficas representan los porcentajes de células positivas para los multímeros.

Descripción detallada de la invención

Todos los términos utilizados en la presente memoria se definen del modo indicado a continuación a menos que se indique lo contrario. El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de longitud.

El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial, siempre que se mantenga el epítopo o epítopos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 14, aproximadamente.

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

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Como se usa en la presente memoria, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente divulgación, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T.

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

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-A*024 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tabla 1: Frecuencias de expresión F del alelo HLA*A024 y de los serotipos más frecuentes del HLA*A02402. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al. 1017-27) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-G_f)^2$. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al. 1211-23).

Frecuencias de expresión del HLA*24 y de los serotipos A*2402 en todo el mundo

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia alélica
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nénets de Rusia	61%
A*2402	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*2402	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*2402	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

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

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

El término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

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

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

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

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

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

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

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

podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

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

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término «fragmento activo» define un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra −solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado− a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquier fragmento de este tipo contendrá necesariamente como parte de su secuencia de aminoácidos un segmento, fragmento o porción, que es sustancialmente idéntico, si no exactamente idéntico, a una secuencia de las SEQ ID N.º: 1 a 33, que corresponden a las proteínas "parentales" de origen natural de las SEQ ID N.º: 1 a 33. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

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

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

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

(I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
(II) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y
(III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

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

Los péptidos originales descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Dichas

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

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

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos descritos en la presente memoria y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

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

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

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de las SEQ ID N.º: 1 a 33 se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 µM, más preferiblemente como máximo de alrededor de 1 nM, y aún más preferentemente como máximo de alrededor de 100 pM, y más preferentemente como máximo de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los CTL de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

Por tanto, los epítopos de la presente divulgación pueden ser idénticos a los epítopos asociados a tumores o específicos de tumores de origen natural o pueden incluir epítopos que difieren en no más de 4 residuos del péptido de referencia, siempre que tengan una actividad antigénica sustancialmente idéntica.

Abordajes inmunoterapéuticos para el tratamiento

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo

mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 12 residuos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

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

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no solo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación. En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27).

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar solo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

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

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

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

Y es más, no existe ninguna pauta terapéutica pensada para los pacientes con cáncer gástrico que presentan recidiva bioquímica después de la prostatectomía radical, normalmente causada por tumor residual *in situ* que no ha sido

extirpado en presencia de crecimiento localmente avanzado del tumor. Sería deseable contar con nuevas estrategias terapéuticas de menor morbilidad y similar eficacia terapéutica a las estrategias terapéuticas disponibles en estos momentos.

En la presente memoria se describen péptidos que son útiles para el tratamiento del cáncer gástrico y de otros tumores que sobreexpresan los péptidos de la divulgación. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado directamente la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras de cáncer gástrico humano primario (véanse el ejemplo 1 y la figura 1).

El gen originario del que derivan los péptidos aparece notablemente sobreexpresado en el cáncer gástrico, el carcinoma de células renales, cáncer de colon, carcinoma de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma, cáncer de próstata, neoplasias benignas y melanoma maligno en comparación con los tejidos normales (véanse el ejemplo 2 y la figura 2), lo cual demuestra el alto grado de asociación del péptido con el tumor, esto es, que tales péptidos tienen una fuerte presencia en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales.

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T destruyen las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células tumorales gástricas que presentan los péptidos derivados.

Todos los péptidos que fueron compatibles con la plataforma de validación –véase el ejemplo 3– de la presente divulgación han demostrado ser capaces de estimular las respuestas de los linfocitos T (véanse el ejemplo 3 y la figura 3). Así pues, los péptidos son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. ej., péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente divulgación en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

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

En una forma de realización especialmente preferida, la composición farmacéutica comprende el péptido en forma de una sal de ácido acético (acetatos) o ácido clorhídrico (cloruros).

Además de ser útil para tratar el cáncer, el péptido de la presente invención también es útil como agente de diagnóstico. Puesto que el péptido se generó a partir de células de cáncer gástrico y puesto que se determinó que el péptido no está presente en tejidos normales, los péptidos pueden usarse para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia del péptido de la invención en biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección del péptido mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al histopatólogo de que el tejido es maligno o está inflamado o enfermo. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

La detección del péptido en una muestra de tejido enfermo puede permitir tomar decisiones sobre el beneficio de las terapias que involucran al sistema inmunológico, especialmente si se sabe o se espera que los linfocitos T estén involucrados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo bien descrito a través del cual las células malignas infectadas escapan a la inmunovigilancia. Por tanto, la presencia del péptido muestra que este mecanismo no es aprovechado por las células analizadas.

El péptido 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 formando complejo con moléculas de MHC. Estas respuestas de linfocitos se pueden utilizar como marcador de pronóstico para decidir sobre pasos terapéuticos adicionales. Estas respuestas también se pueden utilizar como marcador sustituto en un enfoque de inmunoterapia destinado 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 el péptido se pueden considerar 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 injerto contra huésped y huésped contra injerto.

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

Además, se pueden utilizar para verificar el diagnóstico de cáncer de un patólogo basándose en una muestra de biopsia.

La Tabla 2 muestra los péptidos dados a conocer en la presente memoria, sus respectivas SEQ ID N.º y las proteínas originarias de las que pueden surgir dichos péptidos. Todos los péptidos se unen a los alelos HLA A*024.

Tabla 2: Péptidos dados a conocer en la presente memoria

SEQ ID Nº:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
1*	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	ASPM
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1
6	MMP11-001	VWSDVTPLTF	MMP11
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R
8	NFYB-001	VYTTSYQQI	NFYB
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4
10	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	UQCRB
11	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	PPAP2C
12	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9
13	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1
15	MUC6-001	NYEETFPHI	MUC6
16	ASPM-001	RYLWATVTI	ASPM
17	EPHA2-005	VYFSKSEQL	EPHA2
18	MMP3-001	VFIFKGNQF	MMP3
19	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2
20	PLK4-001	QYASRFVQL	PLK4
21	ATAD2-002	KYLTVKDYL	ATAD2
22	COL12A1-001	VYNPTPNSL	COL12A1
23	COL6A3-001	SYLQAANAL	COL6A3
24	FANCI-001	FYQPKIQQF	FANCI
25	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
26	ATAD2-001	AYAIIKEEL	ATAD2
27	ATAD2-003	LYPEVFEKF	ATAD2
28	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	HSP90B1
29	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	SIAH2
30	SLC6A6-001	VYPNWAIGL	SLC6A6
31	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	IQGAP3
32	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3
33	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	KIF2C

Otros péptidos de HLA A*024 interesantes dados a conocer en la presente memoria

SEQ ID Nº:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
34	CCDC88A-001	QYIDKLNEL	CCDC88A
35	CCNB1-003	MYMTVSIIDRF	CCNB1
36	CCND2-001	RYLPQCSYF	CCND2
37	CCNE2-001	IYAPKLQEF	CCNE2
38	CEA-010	IYPDASLLI	CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6
39	CLCN3-001	VYLLNSTTL	CLCN3
40	DNAJC10-001	IYLEVIHNL	DNAJC10
41	DNAJC10-002	AYPTVKFYF	

42	EIF2S3-001	IFSKIVSLF	EIF2S3, LOC255308
43	EIF3L-001	YYYVGFAYL	EIF3L, LOC340947
44	EPPK1-001	RYLEGTSCI	EPPK1
45	ERBB2-001	TYLPTNASLSF	ERBB2
46	GPR39-001	SYATLLHVL	GPR39
47	ITGB4-001	DYTIGFGKF	ITGB4
48	LCN2-001	SYNVTSVLF	LCN2
49	SDHC-001	SYLELVKSL	LOC642502, SDHC
50	PBK-001	SYQKVIELF	PBK
51	POLD3-001	LYLENIDEF	POLD3
52	PSMD14-001	VYISSLALL	PSMD14
53	PTK2-001	RYLPKGFLNQF	PTK2
54	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
55	TSPAN1-002	VYTTMAEHF	TSPAN1
56	ZNF598-001	DYAYLREHF	ZNF598
57	ADAM10-001	LYIQTDHLFF	ADAM10
58	MMP12-001	TYKYVDINTF	MMP12
59	RRM2-001	YFISHVLAF	RRM2
60	TMPRSS4-001	VYTKVSAYL	TMPRSS4
61	TSPAN8-001	VYKETCISF	TSPAN8

En otro aspecto, se dan a conocer péptidos de unión a HLA A*02 contra el cáncer gástrico. En las personas que son positivas para A*02 y/o A*24 se pueden emplear mezclas de los péptidos dados a conocer como tratamiento contra el cáncer gástrico. También se dan a conocer mezclas de 2 a 20 péptidos y las mezclas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 péptidos.

SEQ ID Nº:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
62	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2
63	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
64	LMNB1-001	LADETLLKV	LMNB1
65	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
66	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
67	COPG-001	VLEDLEVTV	COPG, COPG2, TSGA13
68	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
69	COL6A3-003	NLLDLDYEL	COL6A3
70	COL6A3-004	FLIDSSEGV	COL6A3
71	PSMC2-001	ALDEGDIAL	PSMC2
72	UBE2S-001	ALNEEAGRLLL	UBE2S
73	KIF11-001	ILSPTVVSI	KIF11
74	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
75	CCNB1-001	ALVQDLAKA	CCNB1
76	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
77	F2R-001	TLDPRSFLL	F2R
78	OLFM4-001	TLDDLLLYI	OLFM4
79	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
80	CEP250-001	SLAEVNTQL	CEP250
81	HIF1A-001	ALDGFVMVL	HIF1A
82	KRAS-001	GVDDAFYTL	KRAS
83	MET-001	YVDPVITSI	MET
84	NCAPG-001	YLLSYIQSI	NCAPG
85	NCAPG-002	QIDDVTIKI	NCAPG

(continuación)

SEQ ID Nº:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
86	TOP-004	YLYGQTTTYL	TOP2A
87	TOP-005	KLDETGNSL	TOP2A
88	LAMC2-002	RLDDLKMTV	LAMC2
89	AHR-001	LTDEILTYV	AHR
90	CCNB1-002	ILIDWLVQV	CCNB1
91	CEACAM6-001	VLYGPDVPTI	CEACAM6
92	COPB1-001	SIFGEDALANV	COPB1
93	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
94	TPX2-001	KILEDVVGV	TPX2
95	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A, TOP2B

Metaloproteinasa de matriz 11 (MMP11)

Al igual que otras MMP, la MMP11 es una endopeptidasa con funciones en procesos que requieren remodelación de tejidos, tales como el desarrollo, la cicatrización de heridas y la formación de cicatrices. También podría regular negativamente la homeostasis de las grasas al reducir la diferenciación de los adipocitos. A diferencia de otras MMP, no es capaz de escindir las típicas moléculas de la matriz extracelular, excepto el colágeno VI. Sin embargo, se han identificado otros sustratos, tales como alfa 2-macroglobulina, ciertos inhibidores de la serina proteasa (serpinas), incluyendo la alfa 1 antitripsina, la proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina y el receptor de laminina. En el cáncer, MMP11 se expresa principalmente en células estromales que rodean el tejido tumoral. Esto se ha demostrado para numerosas entidades tumorales. Se estableció que MMP11 se sobreexpresa en el estroma de la mayoría de los carcinomas humanos invasivos, pero rara vez en sarcomas y otros tumores no epiteliales. En la mayoría de los casos, pero no en todos, MMP11 se expresa en células del estroma directamente adyacentes al tumor, mientras que las propias células tumorales, los tejidos normales y las células del estroma distantes del tumor son negativas. Los niveles más altos de MMP11 se correlacionan con un fenotipo maligno/mayor invasividad y mal pronóstico. Sin embargo, en los carcinomas papilares de tiroides, la expresión de MMP11 estaba inversamente ligada a características agresivas. MMP11 se encontró en tejido tumoral y en suero de pacientes con cáncer gástrico, y su expresión se correlacionó con metástasis (Yang et al.). Además, (Deng et al. 274-81) mostraron que MMP11 se expresa altamente en estirpes celulares tumorales y en tumores primarios de cáncer gástrico, a diferencia de otros tipos de cáncer no exclusivamente en el estroma, y que parece mejorar la proliferación de células tumorales.

En la presente memoria se da a conocer además un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo de la SEQ ID N.º: 1 a la SEQ ID N.º: 95 o una variante de la misma que es al menos 80 % homóloga a de la SEQ ID N.º: 1 a la SEQ ID N.º: 95 o una variante de la misma que incluye linfocitos T que reaccionan de forma cruzada con dicho péptido, en donde dicho péptido no es un polipéptido de longitud completa.

La presente invención se relaciona, además, con el péptido descrito previamente, dotado de la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

Se da a conocer, no abarcado por las reivindicaciones, un péptido como se ha descrito previamente, en donde el péptido está modificado. La invención también se refiere al péptido de la SEQ ID N.º: 6 que incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere además al péptido de la SEQ ID N.º: 6, en donde el péptido es parte de una proteína de fusión, que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii).

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica el péptido de la SEQ ID N.º: 6, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa.

La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico descrito previamente que es ADN, ADNc, APN, ACN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico descrito previamente.

La presente invención se refiere además al péptido de la SEQ ID N.º: 6, un ácido nucleico que codifica el mismo o un vector de expresión que comprende el ácido nucleico para su uso en medicina.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico que codifica el péptido de la SEQ ID N.º: 6 o un vector de expresión que comprende el ácido nucleico.

La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora descrita que es una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora descrita en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir el péptido de la SEQ ID N.º: 6, método que comprende el cultivo de la célula hospedadora descrita y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno el péptido de la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención se refiere, además, al método descrito, en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método descrito, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido de la SEQ ID N.º: 6.

La presente invención se refiere, además, a los linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, producidos con el método descrito, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 6.

Se da a conocer, además, el uso del péptido de la SEQ ID N.º: 6 en un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 6, comprendiendo el uso administrar al paciente un número efectivo de linfocitos T citotóxicos (CTL) como se ha definido.

La presente invención se refiere, además, al uso del péptido de la SEQ ID N.º: 6, un ácido nucleico que codifica el mismo, un vector de expresión que comprende el ácido nucleico, una célula como la descrita, o un linfocito T citotóxico activado como el descrito como medicamento o para la fabricación de un medicamento.

La presente invención se refiere, además, a un uso en que dicho medicamento es una vacuna.

La presente invención se refiere, además, a un uso como el descrito, en que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso como el descrito, en que dichas células cancerosas son células de cáncer gástrico, gastrointestinal, colorrectal, pancreático, pulmón o renal.

Se da a conocer, pero no abarcada por las reivindicaciones, una proteína marcadora particular que puede usarse en el pronóstico del cáncer gástrico.

Además, se da a conocer el uso de esta diana para el tratamiento del cáncer.

Como se proporciona en la presente memoria, se describió que la proteína codificada por MMP11 está sobreexpresada en el cáncer gástrico en comparación con el tejido gástrico normal y otros tejidos vitales (por ejemplo, hígado, riñón, corazón) en la literatura.

Se demostró que la proteína codificada por MMP11 tiene un papel importante en la tumorgénesis, ya que está implicada en la transformación maligna, el crecimiento celular, la proliferación, la angiogénesis o la invasión del tejido normal.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína MMP11 en tumores está asociada con estadíos avanzados de la enfermedad y mal pronóstico para los pacientes.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos quiméricos. Las estirpes de células inmortales que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención también son parte de la presente invención.

El término «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, el término «anticuerpos» también incluye fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que posean alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador de un cáncer gástrico, administración de una toxina contra una célula de cáncer gástrico que exprese el gen

marcador de cáncer gástrico con un nivel elevado, y/o inhibición de la actividad del polipéptido marcador del cáncer gástrico) descritos en la presente memoria.

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

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

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

Los anticuerpos monoclonales dados a conocer en la presente memoria se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE. UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la divulgación puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348, publicada el 22 de diciembre de 1994 y en la Pat. de EE. UU. N.º 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento que tiene dos sitios de combinación con antígenos y todavía es capaz de reconocer antígenos de reactividad cruzada.

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones concretas o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo sin modificar. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes disulfuro para aumentar la biolongevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos quiméricos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo

receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá casi todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

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

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

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

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

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

Debido a que se ha demostrado que la proteína MMP11 está altamente expresada en al menos un subconjunto de tejidos de cáncer gástrico en comparación con los tejidos normales, la inhibición de su expresión o actividad puede integrarse en cualquier estrategia terapéutica para tratar o prevenir el cáncer gástrico.

El principio de la terapia antisentido se basa en la hipótesis de que es posible suprimir la expresión génica de secuencias específicas (ya sea por vía transcripcional o traduccional) mediante la hibridación en el interior de la célula del ADN genómico o del ARNm con una molécula antisentido complementaria a ellos. La formación de ese ácido nucleico bicatenario híbrido trastoca la transcripción del ADN genómico que codifica el antígeno tumoral que constituye

la diana, o altera el procesamiento/transporte/traducción y/o la estabilidad del ARNm del antígeno tumoral diana.

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

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

En las técnicas susodichas, que incluyen la administración y la absorción de ADN exógeno por las células del sujeto (transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser incorporados a un vector en forma de ADN desnudo o de ácidos nucleicos para suministrar los ácidos nucleicos a las células con los que inhibir la expresión de la proteína marcadora del tumor gástrico. El vector puede estar disponible en una preparación comercial, como un vector adenovírico (Quantum Biotechnologies Inc., Laval, Quebec, Canadá). La liberación del ácido nucleico o del vector en las células se puede materializar a través de varios mecanismos. Como ejemplo, puede ser a través de liposomas con preparaciones comerciales de liposomas como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO- 25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md., EE. UU.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis., EE. UU.), así como otros liposomas desarrollados según los procedimientos habituales en la técnica. Asimismo, el ácido nucleico o el vector de esta invención se pueden suministrar *in vivo* mediante electroporación, una tecnología que ofrece Genetronics, Inc. (San Diego, California, EE. UU.) o mediante un aparato SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, EE. UU.).

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía.

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

El péptido de la invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

Como se usa en la presente memoria, el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. Las secuencias que se comparan en la presente memoria pueden tener una adición o deleción (por ejemplo, un hueco o similar) en la alineación óptima de las dos secuencias. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Fong et al. 8809-14) (Appay et al. 1805-14; Colombetti et al. 2730-38; Zaremba et al. 4570-77).

Por una «variante» de la secuencia de aminoácidos dada los inventores se refieren a que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, reemplazándolas por la cadena lateral de otro residuo de aminoácido de origen natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido siga siendo capaz de unirse a una molécula de HLA sustancialmente de la misma manera que un péptido que consiste en

la secuencia de aminoácidos dada en las SEQ ID N.º: 1 a 33. Por ejemplo, un péptido puede ser modificado de modo que al menos mantenga, si no mejore, la capacidad de interactuar y unirse a la hendidura de unión de una molécula de MHC adecuada, tal como HLA-A*02 o -DR, y de esa manera al menos mantenga, si no mejore, la capacidad de unirse al TCR de CTL activado.

Estos CTL pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural de la SEQ ID N.º: 6 y otras secuencias dadas a conocer en la presente memoria. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee, Bachmann, and Stevanovic) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al. 213-19), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Por tanto, un experto en la técnica sería capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.º: 1 a 95, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y sería capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unirse a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes dadas a conocer en la presente memoria conservan la capacidad de unirse al TCR de CTL activado, que posteriormente pueden reaccionar de forma cruzada y matar células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos naturales de la SEQ ID N.º: 6 y otras secuencias dadas a conocer en la presente memoria.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor de linfocitos T pueden modificarse reemplazándolos por otro aminoácido cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no elimine la unión al MHC relevante.

Tabla 3: Variantes y motivo de los péptidos conforme a la SEQ ID N.º: 1 a 33

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Código de péptido		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID 1	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Código de péptido		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID 2	Variantes			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCHL5-001	Código de péptido		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID 3	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Código de péptido		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID 4	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							F	
				F							I	
PROM-001	Código de péptido		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID 5	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Código de péptido		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID 6	Variantes			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Código de péptido		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID 7	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Código de péptido		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID 8	Variantes			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	
SMC4-001	Código de péptido		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F	
SEQ ID 9	Variantes			F								

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Código de péptido		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID 10	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Código de péptido		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID 11	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Código de péptido		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID 12	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Código de péptido		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID 13	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Código de péptido		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID 14	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Código de péptido		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID 15	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Código de péptido		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID 16	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Código de péptido		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
SEQ ID 17	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Código de péptido		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
SEQ ID 18	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Código de péptido		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
SEQ ID 19	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Código de péptido		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ ID 20	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Código de péptido		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID 21	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Código de péptido		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID 22	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Código de péptido		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID 23	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Código de péptido		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID 24	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Código de péptido		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID 25	Variantes			F								
											L	
											I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Código de péptido		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID 26	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Código de péptido		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID 27	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B 1-001	Código de péptido		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID 28	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Código de péptido		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID 29	Variantes			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Código de péptido		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID 30	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Código de péptido		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID 31	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
ERBB3-001	Código de péptido		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID 32	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Código de péptido		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID 33	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Código de péptido		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID 1	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Código de péptido		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID 2	Variantes			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCHL5-001	Código de péptido		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID 3	Variantes			F								
											F	
											I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Código de péptido		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID 4	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	Código de péptido		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID 5	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Código de péptido		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID 6	Variantes			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Código de péptido		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID 7	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Código de péptido		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID 8	Variantes			F								
											L	
											F	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				F							L	
				F							F	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	Código de péptido		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F	
SEQ ID 9	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Código de péptido		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID 10	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Código de péptido		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID 11	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Código de péptido		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID 12	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Código de péptido		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID 13	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Código de péptido		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID 14	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Código de péptido		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID 15	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Código de péptido		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID 16	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Código de péptido		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
SEQ ID 17	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Código de péptido		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
SEQ ID 18	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Código de péptido		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
SEQ ID 19	Variantes			Y								
											L	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Código de péptido		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
SEQ ID 20	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Código de péptido		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID 21	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Código de péptido		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID 22	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Código de péptido		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID 23	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Código de péptido		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID 24	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Código de péptido		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID 25	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
ATAD2-001	Código de péptido		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID 26	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Código de péptido		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID 27	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B 1-001	Código de péptido		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID 28	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Código de péptido		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID 29	Variantes			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Código de péptido		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID 30	Variantes			F								
											F	
											I	

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Código de péptido		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID 31	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	Código de péptido		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID 32	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Código de péptido		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID 33	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I

También pueden ser adecuados péptidos más largos. También es posible, que los epítopos de MHC de clase I, aunque normalmente tienen entre 8-11 aminoácidos de longitud, se generan mediante el procesamiento de péptidos a partir de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítopo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítopo real sean residuos que no afecten sustancialmente a la escisión proteolítica necesaria para exponer el epítopo real durante el procesamiento.

En consecuencia, en la presente memoria también se dan a conocer péptidos y variantes de epítopos de MHC de clase I en donde el péptido o variante tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y lo más preferiblemente entre 8 y 14, a saber, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos.

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

En un ejemplo, el péptido consiste o consta esencialmente de una secuencia de aminoácidos conforme a de SEQ ID N.º: 1 a la SEQ ID N.º: 95.

«Que consiste esencialmente en» significará que un péptido de conformidad con la presente divulgación, además de la secuencia conforme a de la SEQ ID N.º: 1 a la SEQ ID N.º: 95 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 epítopo para el epítopo de moléculas de MHC.

No obstante, estos tramos pueden ser importantes para proporcionar una introducción eficaz del péptido de

conformidad con la presente divulgación en las células. El péptido también puede ser una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en el siguiente "Ii") que se deriva del NCBI, Número de acceso de GenBank X00497.

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

En un enlace peptídico inverso, los residuos de aminoácidos no se unen mediante enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino que el enlace peptídico se invierte. Tales peptidomiméticos retroinversos se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los descritos en Meziere et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica preparar pseudopéptidos que contienen cambios que implican la cadena principal y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al (1997) muestran que para la unión de MHC y las respuestas de linfocitos T auxiliares, 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 peptídicos es, por ejemplo: $-CH_2$-NH, $-CH_2S$-, $-CH_2CH_2$-, -CH=CH-, $-COCH_2$-, $-CH(OH)CH_2$- i $-CH_2SO$-. La patente de Estados Unidos 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-CH_2$-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$.

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

Además, los péptidos de la divulgación pueden sintetizarse para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, se puede usar el isómero D de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido, en lugar del isómero L habitual. Incluso, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos puede sustituirse por uno de los residuos de aminoácidos no naturales bien conocidos. Alteraciones como estas pueden servir para aumentar la estabilidad, biodisponibilidad y/o acción de unión de los péptidos.

Asimismo, un péptido o variante como se da a conocer en la presente memoria puede 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, 2005. La modificación química de aminoácidos incluye, pero sin limitación, modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), modificación de amida de grupos carboxilo y modificación de sulfhidrilo por oxidación con ácido perfórmico de cisteína a ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol, 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 a Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) para una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

Brevemente, la modificación de, por ejemplo, residuos de arginilo en proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos de dicarbonilo vecinales tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción de metilglioxal con residuos de arginina. La cisteína puede modificarse sin modificación concomitante de otros sitios nucleofílicos tales como lisina e histidina. Como resultado, hay disponible un gran número de reactivos para la modificación de cisteína. Los sitios web de empresas tales como Sigma-Aldrich (http://www.sigma-aldrich.com) proporcionan información sobre reactivos específicos.

La reducción selectiva de enlaces disulfuro en proteínas también es común. Los enlaces disulfuro se pueden formar y oxidar durante el tratamiento térmico de productos biofarmacéuticos.

Se puede usar reactivo K de Woodward para modificar residuos de ácido glutámico específicos. Se puede usar N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar reticulaciones intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico.

Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo para la modificación de residuos de histidilo en proteínas. La histidina también se puede modificar usando 4-hidroxi-2-nonenal.

La reacción de los residuos 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 sitio principal de modificación en la glicosilación de proteínas.

Los residuos de metionina en proteínas pueden modificarse, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

Se pueden usar tetranitrometano y N-acetilimidazol para la modificación de residuos de tirosilo. La reticulación a través de la formación de ditirosina se puede lograr con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

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

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

En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados con la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lu et al. (1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrilo para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloiletilendiamina (entrelazante) y acriloilsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer Marder, and Albericio 29-43) y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej. la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

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

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

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

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen (Saiki et al. 487-91)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo, diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las reveladas en las patentes de EE. UU. N.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757. 006, 4.766.075 y 4.810.648.

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

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

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

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

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

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

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva

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

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

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) son en la actualidad objeto de investigación como tratamiento contra el cáncer de próstata (Sipuleucel–T) (Rini et al. 67-74; Small et al. 3089-94).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para la producción del péptido de la SEQ ID N.º: 6, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante puede ser preparado para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Brunsvig et al. 1553-64; Staehler et al.).

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

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

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

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

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

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítopo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga la SEQ ID N.º: 1 a la SEQ ID N.º: 95 o una secuencia de aminoácidos variante del mismo.

Existen otros métodos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples et al (1995) y Kawakami et al (1992) emplean linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al (1995) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus et al (1997) describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. Hill et al (1995) y Jerome et al (1993) emplean linfocitos B para la producción de CTL autólogos. Asimismo, para la preparación de CTL autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En este estudio, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo, citocinas como la interleucina-12.

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

Los linfocitos T activados que están dirigidos contra el péptido de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto más de la invención proporciona linfocitos T activados que pueden obtenerse con los susodichos métodos de la invención.

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que exprese de forma aberrante un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1 a 95.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo, uniéndosele. Los linfocitos T son útiles para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 6 y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos.

Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen

estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que analizada se le detecte.

En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD8-positivos conformes a la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase I) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase I; (Dengjel et al. 4163-70)).

Los linfocitos T de la presente invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona el péptido de la SEQ ID N.º: 6 para su uso para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

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

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

Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos y se pueden encontrar por ejemplo en (Dudley et al. 850-54; Dudley et al. 2346-57; Rosenberg et al. 889-97; Rosenberg et al. 1676-80; Yee et al. 16168-73); revisado en (Gattinoni et al. 383-93) y (Morgan et al.).

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

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i. d., i. m, s. c., i. p. e i. v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y Longenecker et al. 1993). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos que consisten en la secuencia de la SEQ ID N.º: 6 estimulen a los linfocitos T CD8. No obstante, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, el compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente memoria.

En un aspecto, la vacuna comprende el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 6 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 15 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

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

Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN de naturaleza viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o los péptidos codificados por el ácido nucleico puede ser una proteína de fusión, dotada por ejemplo con un epítopo que estimule a

los linfocitos T específicos del CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej. MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel 932-33). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5.849.589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) [Gabrilovich 1996].

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos T_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T_{H1} provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta T_{H2}. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 471-84). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

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

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

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

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante se selecciona del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, sargramostim), imiquimod y resimiquimod.

En otra forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es imiquimod o resiquimod.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como, por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3th Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Formulaciones de ejemplo se pueden encontrar en EP2113253.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en concreto del cáncer gástrico, del carcinoma de células renales, el cáncer de colon, el carcinoma de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma, cáncer de próstata, neoplasia benigna y melanoma maligno.

La presente invención también incluye un equipo que comprende:

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

El equipo puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (V) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

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

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

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

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

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

El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u

otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes que son componentes del presente equipo.

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

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes fueron facilitados por la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM), Kyoto, Japón, la Facultad de Medicina de la Universidad de la Ciudad de Osaka (OCU), Osaka, Japón, y el Hospital Universitario de Tübingen, Alemania. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80ºC hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

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

Métodos

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia. La Fig. 1 muestra un ejemplo de espectro obtenido de tejido tumoral correspondiente al péptido asociado a MHC de clase I CDC2-001 y su perfil de elución en el sistema UPLC.

EJEMPLO 2

Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos de la presente divulgación

No todos los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de ellos proceden de proteínas celulares normales que se expresan en multitud de tipos de células. Muy pocos de esos péptidos están asociados a tumores y probablemente sean capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de descubrirlos y de minimizar el riesgo de que la vacuna genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido.

Para identificar los péptidos que derivaban de genes dotados con un perfil de expresión similar al ideal los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

Fuentes de ARN y preparación

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

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, CA, EE. UU.). El ARN de varios individuos (de 2 y 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.

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

Experimentos con micromatrices

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

Los perfiles de expresión de los genes originarios que aparecen altamente sobreexpresados en el cáncer gástrico se muestran en la Fig. 2.

EJEMPLO 3

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I delMA941

Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los TUMAP dados a conocer en la presente memoria, llevamos a cabo un análisis con una conocida plataforma de estimulación *in vitro* descrita por (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). Con este sistema hemos podido demostrar resultados positivos de inmunogenicidad (es decir, de expansión de linfocitos T específicos) en 47 de 54 TUMAP restringidos a HLA-A*2402 y en 3 de 3 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 analizados, dados a conocer en la presente memoria, lo cual demuestra que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 4).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A*24 o de capas leucocíticas HLA-A*2 de donantes sanos obtenidas del Banco de sangre de Tubinga.

Los linfocitos CD8+ fueron directamente enriquecidos o primero se aislaban las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con un medio de separación en gradiente estándar (PAA, Cölbe, Alemania). Los linfocitos CD8+ o las PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico

1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En esta etapa del cultivo al medio TCM también se le añadieron IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Núremberg, Alemania). El aislamiento de los linfocitos CD8+ se efectuó por selección positiva con microperlas MicroBeads CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania).

La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros (Walter et al. 4974-78) con pequeñas modificaciones. En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes HLA-A*2402 y HLA-A*0201 cargadas con el péptido y biotiniladas desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada. El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9. 3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung, Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los pMHC usados como controles de alta y baja inmunogenicidad fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800. 000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng de pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente $1x10^6$ linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37°C, 5% de CO_2 y humedad relativa del 95%. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37°C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces.

Finalmente, se realizaron análisis multiméricos tiñendo las células con multímeros A*0201 o A*2402 fluorescentes (producidos según la descripción de {Altman, 1996 ALTMAN1996 /id}) y anticuerpo CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) o adicionalmente con un marcador de viabilidad (Colorante vital Live/dead-Aqua o colorante Violet (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y se hicieron en un citómetro FACSCalibur (BD) de cuatro colores o en un LSRII SORP (BD; dieciocho colores, equipado con azul (488 nm), violeta (405 nm), rojo (640 nm) y verde (532 nm), respectivamente.

Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FCSExpress o FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones de los respectivos controles negativos (estimulación con el multímero irrelevante y tinción con el multímero relevante) y las células no estaban localizadas en la diagonal de la gráfica).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de IMA941

En 47 de los 54 péptidos HLA-A*2402 y en 3 de los 3 péptidos HLA-A*0201 analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se pudo demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 se muestran a modo de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de dos péptidos dados a conocer en la presente memoria tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados correspondientes a los 54 péptidos A*2402 y a los 3 péptidos A*0201 dados a conocer se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I

Los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por Immatics presentan el porcentaje de donantes y de pocillos que dieron positivo entre los evaluables. Como mínimo resultaron evaluables cuatro donantes y 48 pocillos de cada péptido.			
SEQ ID N.º:	**Antígeno**	**Donantes positivos/evaluables [%]**	**Pocillos positivos/evaluables [%]**
1	CDC2-001	83	28
2	ASPM-002	67	32
18	MMP3-001	11	1
4	MET-006	67	21
3	UCHL5-001	75	12
7	MST1R-001	50	13
33	KIF2C-001	17	2
9	SMC4-001	73	10
17	EPHA2-005	0	0
5	PROM1-001	83	26
6	MMP11-001	33	11
8	NFYB-001	50	7
16	ASPM-001	17	3
20	PLK4-001	60	5
14	ABL1-001	83	18
26	ATAD2-001	33	3
21	ATAD2-002	17	1
27	ATAD2-003	0	0
12	AVL9-001	100	31
22	COL12A1-001	0	0
23	COL6A3-001	0	0
24	FANCI-001	17	1
28	HSP90B1-001	50	7
15	MUC6-001	83	22
13	NUF2-001	100	50
19	NUF2-002	50	6
11	PPAP2C-001	83	29
25	RPS11-001	17	3
29	SIAH2-001	50	8
30	SLC6A6-001	17	1
10	UQCRB-001	83	24
31	IQGAP3-001	100	24
32	ERBB3-001	83	
	CCDC88A-001	0	0
	CCNB1-003	33	3
	CCND2-001	17	10
	CCNE2-001	0	0
	CEA-010	40	3
	CLCN3-001	33	6
	DNAJC10-001	50	15
	DNAJC10-002	33	3
	EIF2S3-001	17	1
	EIF3L-001	100	29
	EPPK1-001	17	1
	GPR39-001	50	6
	ITGB4-001	67	20
	LCN2-001	17	1
	SDHC-001	33	3
	PBK-001	0	0
	POLD3-001	67	7
	PSMD14-001	17	1
	PTK2-001	17	4
	TSPAN1-002	17	1
	ZNF598-001	83	17

Los péptidos siguientes ya han sido descritos en otras solicitudes presentadas por Immatics y están incluidos en las

vacunas IMA901 (MET-001 y TOP-001), IMA910 (MET-001 y TOP-001) e IMA950 (IGF2BP3-001). Por ejemplo, MET-001 propicia reacciones *in vivo* extremadamente buenas y los datos se pueden considerar como una indicación de la utilidad clínica de los péptidos dados a conocer en la presente memoria.

SEQ ID N.º:	Antígeno	Donantes positivos/evaluables [%]	Pocillos positivos/evaluables [%]
	IGF2BP3-001	50	21
	MET-001	67	42
	TOP-001	40	10

Lista de referencias bibliográficas

Ahmed, A. U., et al. "Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth." J Natl.Cancer Inst. 100.22 (2008): 1606-29.

Allison, J. P. and M. F. Krummel. "The Yin and Yang of T cell costimulation." Science 270.5238 (1995): 932-33.

Altmeyer, A., et al. "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." Int J Cancer 69.4 (1996): 340-49.

Appay, V., et al. "Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide." Eur.J Immunol. 36.7 (2006): 1805-14.

Banerjee, S. K., et al. "Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation." Am J Pathol. 156.1 (2000): 217-25.

Bartman, A. E., et al. "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." Int J Cancer 80.2 (1999): 210-18.

Basu, S., et al. "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol. 12.11 (2000): 1539-46.

Bauer, B., S. Bartfeld, and T. F. Meyer. "H. pylori selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA." Cell Microbiol. 11.1 (2009): 156-69.

Benatti, P., et al. "A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response." Nucleic Acids Res 36.5 (2008): 1415-28.

Bertolini, G., et al. "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 106.38 (2009): 16281-86.

Bierie, B. and H. L. Moses. "TGF-beta and cancer." Cytokine Growth Factor Rev. 17.1-2 (2006): 29-40.

Bitoun, E. and K. E. Davies. "The robotic mouse: unravelling the function of AF4 in the cerebellum." Cerebellum. 4.4 (2005): 250-60.

Bolhassani, A. and S. Rafati. "Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development." Expert.Rev.Vaccines. 7.8 (2008): 1185-99.

Borset, M., et al. "The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies." Leuk.Lymphoma 32.3-4 (1999): 249-56.

Bradbury, P. A., et al. "Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis." Carcinogenesis 30.5 (2009): 793-98.

Brown, C. E., et al. "Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells." Cancer Research 69.23 (2009): 8886-93.

Bruckdorfer, T., O. Marder, and F. Albericio. "From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future." Curr.Pharm.Biotechnol. 5.1 (2004): 29-43.

Brunsvig, P. F., et al. "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol.Immunother. 55.12 (2006): 1553-64.

Cabanes, D., et al. "Gp96 is a receptor for a novel Listeria monocytogenes virulence factor, Vip, a surface protein." EMBO J 24.15 (2005): 2827-38.

Calzado, M. A., et al. "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." Nat.Cell Biol. 11.1 (2009): 85-91.

Castelli, C., et al. "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." Cancer Immunol.Immunother. 53.3 (2004): 227-33.

Castriconi, R., et al. "Both CD133+ and C." Eur.J Immunol. 37.11 (2007): 3190-96.

Chanock, S. J., et al. "HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA." Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-23.

Chen, C. H., et al. "Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.16 (2003): 9226-31.

Chen, Z. and J. J. O'Shea. "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." Cytokine 41.2 (2008): 71-78.

Cho, S. O., et al. "Helicobacter pylori in a Korean Isolate Expressed Proteins Differentially in Human Gastric Epithelial Cells." Dig.Dis.Sci. (2009).

Christianson, J. C., et al. "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." Nat.Cell Biol. 10.3 (2008): 272-82.

Cisek, L. J. and J. L. Corden. "Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2." Nature 339.6227 (1989): 679-84.

Colombetti, S., et al. "Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through

signaling mediated by the mammalian target of rapamycin." J Immunol. 176.5 (2006): 2730-38.
Confalonieri, S., et al. "Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor." Oncogene 28.33 (2009): 2959-68.
Corso, S., et al. "Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases." Oncogene 27.5 (2008): 684-93.
Cox, C. V., et al. "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." Blood 113.14 (2009): 3287-96.
Cunha-Ferreira, I., et al. "The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4." Curr.Biol. 19.1 (2009): 43-49.
DeLuca, J. G., et al. "Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites." Mol.Biol.Cell 16.2 (2005): 519-31.
Deng, H., et al. "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." Biochem.Biophys.Res Commun. 326.2 (2005): 274-81.
Dengjel, J., et al. "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." Clin Cancer Res. 12.14 (2006): 4163-70.
Deremer, D. L., C. Ustun, and K. Natarajan. "Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia." Clin Ther. 30.11 (2008): 1956-75.
Di Renzo, M. F., et al. "Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer." Clin.Cancer Res. 1.2 (1995): 147-54.
Dong, G., et al. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res. 61.15 (2001): 5911-18.
Dudley, M. E., et al. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science 298.5594 (2002): 850-54.
Dudley, M. E., et al. "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." J.Clin.Oncol. 23.10 (2005): 2346-57.
Duong, C., et al. "Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer." Ann Surg Oncol 14.12 (2007): 3602-09.
Egland, K. A., et al. "High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.15 (2006): 5929-34.
Eramo, A., et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ 15.3 (2008): 504-14.
Esashi, F., et al. "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." Nature 434.7033 (2005): 598-604.
Escobar, M. A., et al. "Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines: the search for fingerprints." J Pediatr.Surg 40.2 (2005): 349-58.
Ferracini, R., et al. "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit." Oncogene 10.4 (1995): 739-49.
Fischer, J., et al. "Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours." Oncogene 17.6 (1998): 733-39.
Flanagan, J. M., et al. "Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets." Mol.Cancer Ther. 8.1 (2009): 249-60.
Fong, L., et al. "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.15 (2001): 8809-14.
Frasor, J., et al. "Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 102.37 (2005): 13153-57.
Frew, I. J., et al. "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." Mol.Cell Biol. 23.24 (2003): 9150-61.
Fu, Y. and A. S. Lee. "Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy." Cancer Biol.Ther. 5.7 (2006): 741-44.
Furge, K. A., et al. "Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10722-27.
Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." Oncogene 19.49 (2000): 5582-89.
Gattinoni, L., et al. "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat.Rev.Immunol. 6.5 (2006): 383-93.
Gherardi, E. and M. Stoker. "Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met." Cancer Cells 3.6 (1991): 227-32.
Glen, A., et al. "iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression." J Proteome.Res 7.3 (2008): 897-907.
Gnjatic, S., et al. "NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer." Int J Cancer (2009).
Guo, W. C., et al. "Expression and its clinical significance of heat shock protein gp96 in human osteosarcoma." Neoplasma 57.1 (2010): 62-67.
Habelhah, H., et al. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." EMBO J 21.21 (2002): 5756-65.
Hamamoto, A., et al. "Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma

xenografts." Int J Oncol 26.4 (2005): 891-96.
Harada, T., et al. "Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques." Pancreatology. 9.1-2 (2009): 13-24.
Harper, L. J., et al. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma." J Oral Pathol.Med 36.10 (2007): 594-603.
Hayama, S., et al. "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis." Cancer Research 66.21 (2006): 10339-48.
Hayashi, M., et al. "High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer." Clinical Cancer Research 14.23 (2008): 7843-49.
Heike, M., et al. "Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer." Int J Cancer 86.4 (2000): 489-93.
Hodorova, I., et al. "Gp96 and its different expression in breast carcinomas." Neoplasma 55.1 (2008): 31-35.
Horton, R. A., et al. "A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein." Anal.Biochem. 360.1 (2007): 138-43.
House, C. M., A. Moller, and D. D. Bowtell. "Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways." Cancer Research 69.23 (2009): 8835-38.
Howard, E. W., et al. "Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer." Clin Exp.Metastasis 25.5 (2008): 497-508.
Hu, G. and E. R. Fearon. "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." Mol.Cell Biol. 19.1 (1999): 724-32.
Huang, Y., et al. "Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells." Mol.Cell Biochem. 308.1-2 (2008): 133-39.
Jansen, M. P., et al. "Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat. 116.2 (2009): 263-71.
Jia, H. L., et al. "Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma." Clinical Cancer Research 13.4 (2007): 1133-39.
Jucker, M., et al. "The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma." Leuk.Res. 18.1 (1994): 7-16.
Jung, G., J. A. Ledbetter, and H. J. Muller-Eberhard. "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." Proc Natl Acad Sci U S A 84.13 (1987): 4611-15.
Jung, H. M., S. J. Choi, and J. K. Kim. "Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers." J Cell Biochem. 106.4 (2009): 703-13.
Kaneko, N., et al. "siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis." Biochem.Biophys.Res Commun. 390.4 (2009): 1235-40.
Kang, H. M., et al. "Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression." J Clin Gastroenterol. 42.1 (2008): 29-35.
Ko, M. A., et al. "Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis." Nat.Genet. 37.8 (2005): 883-88.
Kobayashi, M., et al. "Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas." Oncogene 22.9 (2003): 1294-301.
Koochekpour, S., et al. "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas." Cancer Res. 57.23 (1997): 5391-98.
Korzeniewski, N., et al. "Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels." Cancer Research 69.16 (2009): 6668-75.
Krieg, A. M. "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat.Rev.Drug Discov. 5.6 (2006): 471-84.
Kunimoto, K., et al. "Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development." J Cell Physiol 220.3 (2009): 621-31.
Kuriyama, R., et al. "Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells." J Cell Sci. 122.Pt 12 (2009): 2014-23.
Lee, H. S., et al. "MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators." Cancer 92.6 (2001): 1427-34.
Leivo, I., et al. "Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation." Cancer Genet.Cytogenet. 156.2 (2005): 104-13.
Lemmel, C., et al. "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling." Nat.Biotechnol. 22.4 (2004): 450-54.
Li, G., et al. "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development." Oncogene 20.56 (2001): 8125-35.
Lim, S. O., et al. "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World J Gastroenterol. 11.14 (2005): 2072-79.
Lin, W., et al. "Tyrosine kinases and gastric cancer." Oncogene 19.49 (2000): 5680-89.
Liu, B. and Z. LI. "Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." Blood 112.4 (2008): 1223-30.
Liu, S. Y., et al. "Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas." J Oral Pathol.Med 36.7 (2007): 430-35.
Lochter, A., et al. "The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression." Ann

N.Y.Acad.Sci. 857 (1998): 180-93.
Lund, C. V., et al. "Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology." Mol.Cell Biol. 25.20 (2005): 9082-91.
Ma, S., et al. "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." Gastroenterology 132.7 (2007): 2542-56.
MacLeod, R. J., M. Hayes, and I. Pacheco. "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 293.1 (2007): G403-G411.
Macmillan, J. C., et al. "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." Ann Surg Oncol 8.9 (2001): 729-40.
Maney, T., et al. "The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view." Int Rev.Cytol. 194 (2000): 67-131.
Martin, C. M., et al. "Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy." Methods Mol.Biol. 511 (2009): 333-59.
Matsukita, S., et al. "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." Histopathology 42.1 (2003): 26-36.
Maulik, G., et al. "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." Cytokine Growth Factor Rev. 13.1 (2002): 41-59.
Mizrak, D., M. Brittan, and M. Alison. "CD133: molecule of the moment." J Pathol. 214.1 (2008): 3-9.
Montesano, R., et al. "Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis." Cell Growth Differ. 9.5 (1998): 355-65.
Monzani, E., et al. "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." Eur.J Cancer 43.5 (2007): 935-46.
Moore, A. and L. Wordeman. "The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis." Trends Cell Biol. 14.10 (2004): 537-46.
Morgan, R. A., et al. "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes." Science (2006).
Mori, M., et al. "HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry." Transplantation 64.7 (1997): 1017-27.
Murray, G. I., et al. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer." Gut 43.6 (1998): 791-97.
Murshid, A., J. Gong, and S. K. Calderwood. "Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation." Expert.Rev.Vaccines. 7.7 (2008): 1019-30.
Nakaigawa, N., et al. "Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma." Cancer Res. 66.7 (2006): 3699-705.
Nakamura, Y., et al. "Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer." Br.J Cancer 97.4 (2007): 543-49.
Nakayama, K., J. Qi, and Z. Ronai. "The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response." Mol.Cancer Res 7.4 (2009): 443-51.
Naldini, L., et al. "Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET." Oncogene 6.4 (1991): 501-04.
Nguyen, Q. N., et al. "Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells." Biochim.Biophys.Acta 1758.3 (2006): 394-403.
Nishio, K., et al. "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." Biochem.Biophys.Res Commun. 390.3 (2009): 855-60.
Nojima, H., et al. "IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade." Nat.Cell Biol. 10.8 (2008): 971-78.
Nomura, H., et al. "Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas." Int J Cancer 69.1 (1996): 9-16.
Nomura, H., et al. "Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis." Br.J Cancer 97.6 (2007): 792-801.
Ohnuma, S., et al. "Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSNM genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues." Surgery 145.1 (2009): 57-68.
Park, Y. H., et al. "Capecitabine in combination with Oxaliplatin (XELOX) as a first-line therapy for advanced gastric cancer." Cancer Chemother.Pharmacol. (2007).
Pascolo, S., et al. "The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells." Int.Immunol. 17.2 (2005): 117-22.
Peel, N., et al. "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." Curr.Biol. 17.10 (2007): 834-43.
Pereira, M. B., et al. "Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues." J Clin Pathol. 54.3 (2001): 210-13.
Pietra, G., et al. "Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells." Int Immunol. 21.7 (2009): 793-801.
Poller, D. N., et al. "Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas." J Pathol. 168.3 (1992): 275-80.
Pons, E., C. C. Uphoff, and H. G. Drexler. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines." Leuk.Res. 22.9 (1998): 797-804.
Ponzetto, C., et al. "A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with

the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." Mol.Cell Biol. 13.8 (1993): 4600-08.
Poppe, M., et al. "Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility." Oncogene 26.24 (2007): 3462-72.
Pytel, D., et al. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." Anticancer Agents Med Chem. 9.1 (2009): 66-76.
Qi, J., et al. "The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 105.43 (2008): 16713-18.
Qian, C. N., et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." Cancer Res. 62.2 (2002): 589-96.
Qian, Z., et al. "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia." Chem.Biol.Interact. (2009).
Ramirez, R., et al. "Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma." Clin Endocrinol.(Oxf) 53.5 (2000): 635-44.
Rammensee, H. G., et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50.3-4 (1999): 213-19.
Rammensee, H. G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1997.
Rappa, G., O. Fodstad, and A. Lorico. "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." Stem Cells 26.12 (2008): 3008-17.
Richardson, G. D., et al. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." J Cell Sci. 117.Pt 16 (2004): 3539-45.
Rini, B. I., et al. "Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy." Cancer 107.1 (2006): 67-74.
Rodrigues-Martins, A., et al. "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." Science 316.5827 (2007): 1046-50.
Rosenberg, S. A., et al. "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N.Engl.J.Med. 316.15 (1987): 889-97.
Rosenberg, S. A., et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N.Engl.J Med 319.25 (1988): 1676-80.
Rott, R., et al. "Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells." J Biol.Chem. 283.6 (2008): 3316-28.
Rutella, S., et al. "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." Clinical Cancer Research 15.13 (2009): 4299-311.
Saiki, R. K., et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239.4839 (1988): 487-91.
Samant, G. V. and P. W. Sylvester. "gamma-Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent PI3K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells." Cell Prolif. 39.6 (2006): 563-74.
Sanidas, E. E., et al. "Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer." Int J Cancer 54.6 (1993): 935-40.
Scott, G. K., et al. "Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b." J Biol.Chem. 282.2 (2007): 1479-86.
Sergina, N. V., et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3." Nature 445.7126 (2007): 437-41.
Shah, M., et al. "Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis." Pigment Cell Melanoma Res 22.6 (2009): 799-808.
Shapiro, G. I. "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment." J Clin Oncol 24.11 (2006): 1770-83.
Sherman-Baust, C. A., et al. "Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells." Cancer Cell 3.4 (2003): 377-86.
Sheu, M. L., S. H. Liu, and K. H. Lan. "Honokiol induces calpain-mediated glucose-regulated protein-94 cleavage and apoptosis in human gastric cancer cells and reduces tumor growth." PLoS.ONE. 2.10 (2007): e1096.
Shimo, A., et al. "Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis." Cancer Sci. 99.1 (2008): 62-70.
Singh, S. K., et al. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res. 63.18 (2003): 5821-28.
Singh, S. K., et al. "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature 432.7015 (2004): 396-401.
Sithanandam, G. and L. M. Anderson. "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther. 15.7 (2008): 413-48.
Sithanandam, G., et al. "Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549." Oncogene 24.11 (2005): 1847-59.
Skawran, B., et al. "Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions." Mod.Pathol. 21.5 (2008): 505-16.
Slesak, B., et al. "Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis." Anticancer Res 18.4A (1998): 2727-32.
Small, E. J., et al. "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." J Clin Oncol. 24.19 (2006): 3089-94.

Smith, L. M., et al. "CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." Br.J Cancer 99.1 (2008): 100-09.
Smith, M. J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification." Br.J Cancer 100.9 (2009): 1452-64.
Smogorzewska, A., et al. "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell 129.2 (2007): 289-301.
Staehler, M., Stenzl, A., Dietrich, P. Y., Eisen, T., Haferkamp, A., Beck, J., Mayer, A., Walter, S., Singh-Jasuja, H., and Stief, C. A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 in renal cell carcinoma patients (RCC). Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098. 6-20-2007. Ref Type: Abstract
Stemmann, O., et al. "Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase." Cell 107.6 (2001): 715-26.
Suetsugu, A., et al. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." Biochem.Biophys.Res.Commun. 351.4 (2006): 820-24.
Suva, M. L., et al. "Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma." Cancer Research (2009).
Swallow, C. J., et al. "Sak/Plk4 and mitotic fidelity." Oncogene 24.2 (2005): 306-12.
Szczepanowski, M., et al. "Regulation of repp86 stability by human Siah2." Biochem.Biophys.Res Commun. 362.2 (2007): 485-90.
Tajima, Y., et al. "Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background." Clinical Cancer Research 12.21 (2006): 6469-79.
Takaishi, S., et al. "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." Stem Cells 27.5 (2009): 1006-20.
Takayama, H., et al. "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.2 (1997): 701-06.
Teofili, L., et al. "Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease." Blood 97.4 (2001): 1063-69.
Thorsen, K., et al. "Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis." Mol.Cell Proteomics. 7.7 (2008): 1214-24.
Tirino, V., et al. "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer." Eur.J Cardiothorac.Surg 36.3 (2009): 446-53.
Todaro, M., et al. "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." Cell Stem Cell 1.4 (2007): 389-402.
Topol, L., et al. "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol. 162.5 (2003): 899-908.
Toribara, N. W., et al. "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." J Biol.Chem. 268.8 (1993): 5879-85.
Tsan, M. F. and B. Gao. "Heat shock protein and innate immunity." Cell Mol.Immunol. 1.4 (2004): 274-79.
Tuck, A. B., et al. "Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma." Am.J.Pathol. 148.1 (1996): 225-32.
Vairaktaris, E., et al. "Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer." Anticancer Res 27.6B (2007): 4095-100.
Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza. "Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum." Cytokine 33.5 (2006): 264-73.
Walter, S., et al. "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres." J.Immunol. 171.10 (2003): 4974-78.
Wang, Q., et al. "Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance." Cancer Detect.Prev. 29.6 (2005): 544-51.
Wang, R., et al. "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice." J.Cell Biol. 153.5 (2001): 1023-34.
Wang, R. Q. and D. C. Fang. "Effects of Helicobacter pylori infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues." J Gastroenterol.Hepatol. 21.2 (2006): 425-31.
Wang, S., et al. "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth." J Cell Sci. 120.Pt 4 (2007): 567-77.
Wang, X., et al. "Immunolocalisation of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in colonic adenocarcinoma." Acta Histochem. 110.2 (2008): 117-23.
Wang, X. P., et al. "Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma." World J Gastroenterol. 11.3 (2005): 429-32.
Wang, X. P., et al. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma." World J Gastroenterol. 11.7 (2005): 1056-59.
Wang, X. P., Q. X. Wang, and X. P. Ying. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human gastric adenocarcinoma." Tohoku J Exp.Med 212.1 (2007): 35-41.
Weinschenk, T., et al. "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." Cancer Res. 62.20 (2002): 5818-27.
White, C. D., M. D. Brown, and D. B. Sacks. "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis." FEBS Lett. 583.12 (2009): 1817-24.
Wicks, S. J., et al. "Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway." Biochem.Soc

Trans. 34.Pt 5 (2006): 761-63.
Wicks, S. J., et al. "The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling." Oncogene 24.54 (2005): 8080-84.
Yajima, S., et al. "Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer." Int J Oncol 31.5 (2007): 1029-37.
Yang, L., et al. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." Nature (2008).
Yang, S., et al. "Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer." Biochim.Biophys.Acta 1772.9 (2007): 1033-40.
Yao, D. F., et al. "Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int 5.3 (2006): 381-86.
Yasui, W., et al. "Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas." Int J Cancer 53.1 (1993): 36-41.
Yee, C., et al. "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.25 (2002): 16168-73.
Yin, S., et al. "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." Int.J Cancer 120.7 (2007): 1444-50.
Yokozaki, H., W. Yasui, and E. Tahara. "Genetic and epigenetic changes in stomach cancer." Int Rev.Cytol. 204 (2001): 49-95.
Yuan, W., et al. "Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis." Pathol.Oncol Res 15.3 (2009): 473-78.
Yuan, W. J., et al. "Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients." Dig.Dis.Sci. 54.11 (2009): 2410-17.
Zaremba, S., et al. "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen." Cancer Res. 57.20 (1997): 4570-77.
Zhang, X., R. M. Kedl, and J. Xiang. "CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones." Biochem.Biophys.Res Commun. 379.4 (2009): 954-58.
Zhang, X. L., et al. "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." World J Surg 33.10 (2009): 2112-18.
Zhao, C., et al. "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." Nature (2009).
Zheng, H., et al. "Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity." J Immunol. 167.12 (2001): 6731-35.
Zheng, H., et al. "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." J Cancer Res Clin Oncol 132.12 (2006): 817-23.
Zheng, H. C., et al. "Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas." Hum.Pathol. 39.7 (2008): 1042-49.
Zhou, G., et al. "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers." Mol.Cell Proteomics. 1.2 (2002): 117-24.
Zhou, L., et al. "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." Nature 453.7192 (2008): 236-40.
Zhu, K. J., et al. "Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." Int Immunopharmacol. 9.4 (2009): 412-17.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El péptido de conformidad con la reivindicación 1, que tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I humano.

3. El péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos.

4. El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii).

5. Un ácido nucleico, que codifica un péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siempre que dicho péptido no sea la proteína humana completa, en donde preferiblemente dicho ácido nucleico es ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.

6. Un péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un ácido nucleico o vector de expresión de conformidad con la reivindicación 5 para su uso en medicina.

7. Una célula hospedadora, que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de conformidad con la reivindicación 5, que preferiblemente es una célula presentadora de antígeno, tal como, por ejemplo, una célula dendrítica.

8. Un método para producir un péptido de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de conformidad con la reivindicación 7, y aislar dicho péptido de la célula hospedadora o su medio de cultivo.

9. Un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el método poner en contacto CTL *in vitro* con moléculas de MHC de clase I humano cargadas de antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, en donde dicho antígeno es un péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde opcionalmente dicha célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2.

10. Un linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido por el método de conformidad con la reivindicación 9, que reconoce selectivamente una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en la reivindicación 1 o 2.

11. Un linfocito T citotóxico (CTL) de conformidad con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de células cancerosas en un paciente en donde dichas células cancerosas presentan un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos dada en la reivindicación 1 o 2.

12. El péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2, el ácido nucleico o un vector de expresión de conformidad con la reivindicación 5, la célula de conformidad con la reivindicación 7 o el linfocito T citotóxico activado de conformidad con la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de cáncer, tal como cáncer gástrico, gastrointestinal, colorrectal, pancreático, de pulmón o renal.

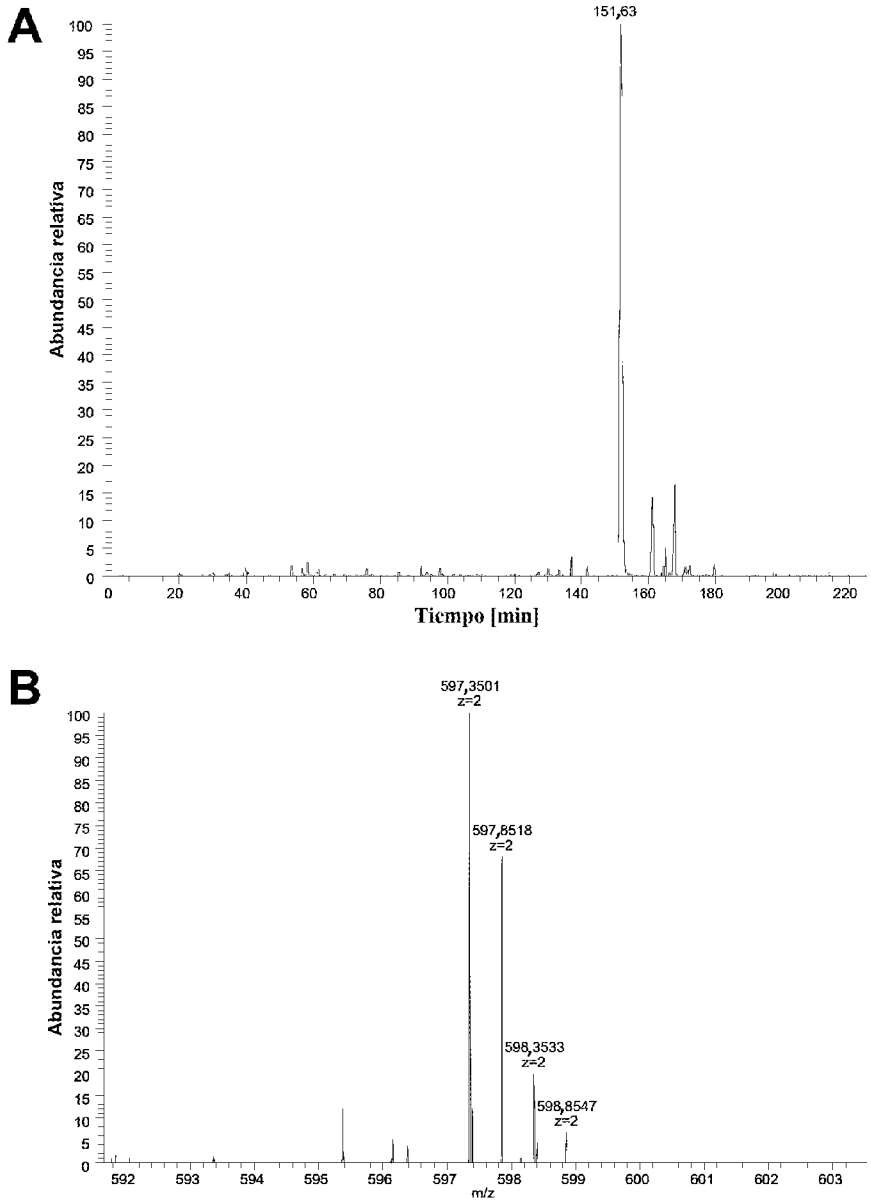
13. El péptido, el ácido nucleico o un vector de expresión, la célula o el linfocito T citotóxico activado para su uso de conformidad con la reivindicación 12, en donde dichos péptidos son para su uso como vacuna.

14. Uso no terapéutico del péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2 para la generación y desarrollo de anticuerpos que son específicos contra un complejo MHC/péptido que comprende dicho péptido.

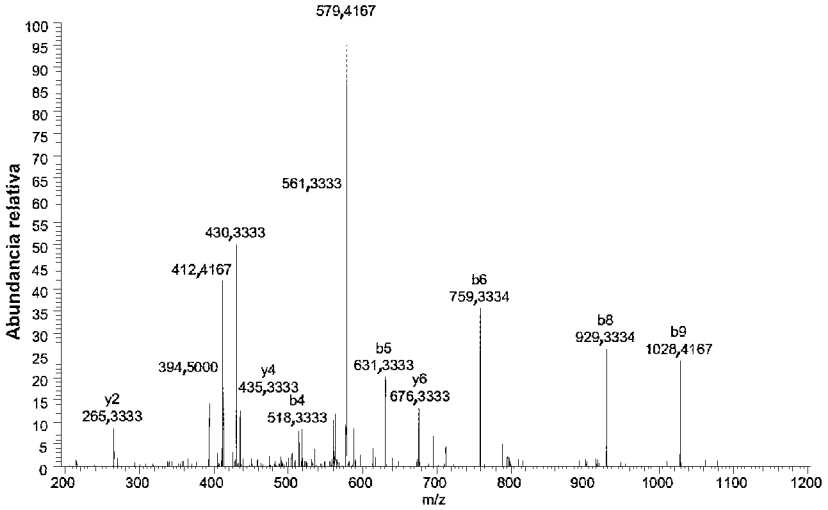
15. Un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a un complejo MHC/péptido que comprende un péptido de conformidad con la reivindicación 1 o 2.

16. Un receptor de linfocitos T que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º: 6 en complejo con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I, para su uso como medicamento o para su uso en medicina.

Figura 1:


A
151,63
Abundancia relativa
Tiempo [min]
B
597,3501
z=2
597,8518
z=2
598,3533
z=2
598,8547
z=2
Abundancia relativa
m/z

C


579,4167
561,3333
430,3333
412,4167
394,5000
y4
435,3333
y2
265,3333
b4
518,3333
b5
631,3333
y6
676,3333
b6
759,3334
b8
929,3334
b9
1028,4167
Abundancia relativa
m/z

D

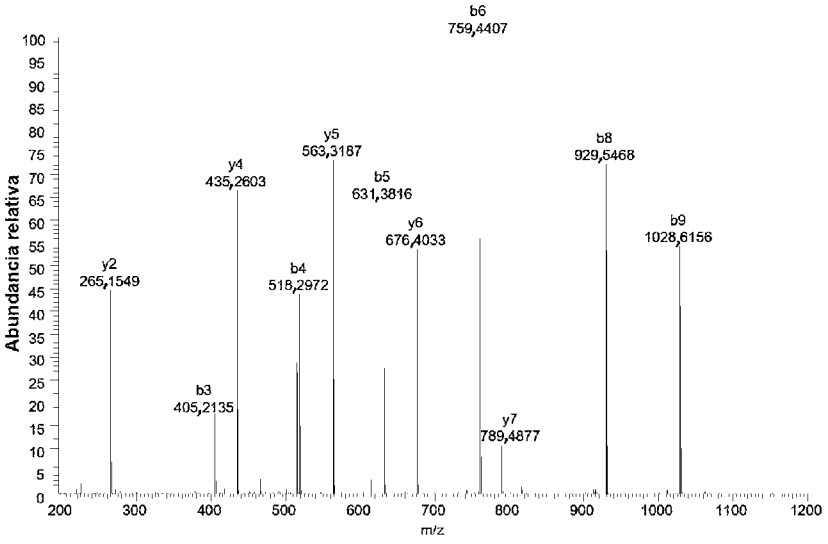

b6
759,4407
y5
563,3187
y4
435,2603
b5
631,3816
y6
676,4033
b8
929,5468
b9
1028,6156
y2
265,1549
b4
518,2972
b3
405,2135
y7
789,4877
Abundancia relativa
m/z

Figura 2:

a)

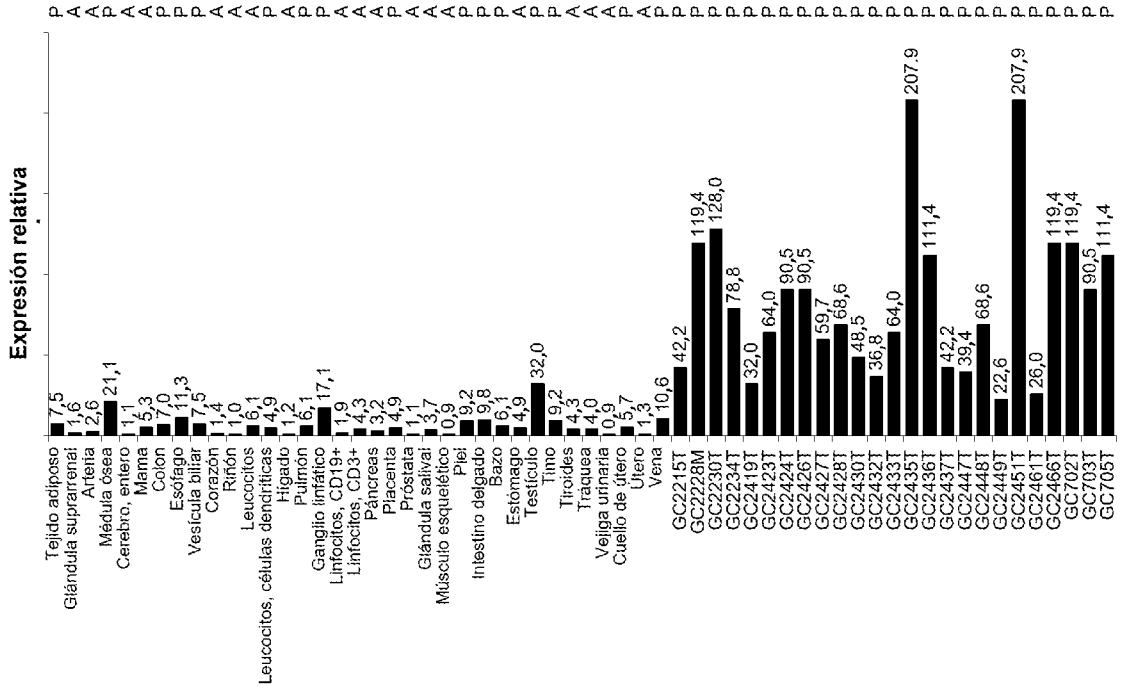
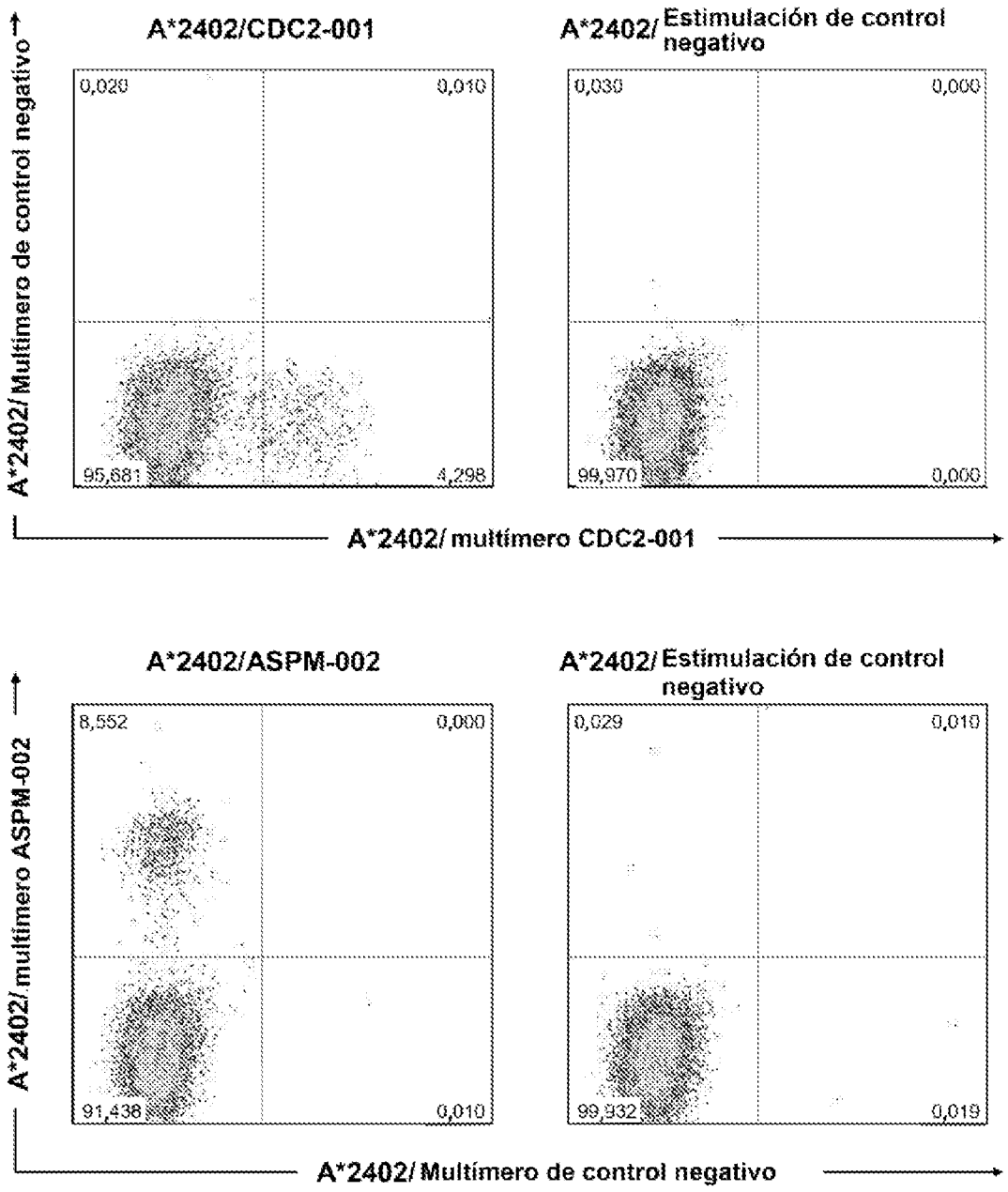

Expresión relativa
Tejido adiposo 7,5
Glándula suprarrenal 1,6
Arteria 2,6
Médula ósea 21,1
Cerebro, entero 1,1
Mama 5,3
Colon 7,0
Esófago 11,3
Vesícula biliar 7,5
Corazón 1,4
Riñón 1,0
Leucocitos 6,1
Leucocitos, células dendríticas 4,9
Hígado 1,2
Pulmón 6,1
Ganglio linfático 17,1
Linfocitos, CD19+ 1,9
Linfocitos, CD3+ 4,3
Páncreas 3,2
Placenta 4,9
Próstata 1,1
Glándula salival 3,7
Músculo esquelético 0,9
Piel 9,2
Intestino delgado 9,8
Bazo 6,1
Estómago 4,9
Testículo 32,0
Timo 9,2
Tiroides 4,3
Tráquea 4,0
Vejiga urinaria 0,9
Cuello de útero 5,7
Útero 1,3
Vena 10,6
GC2215T 42,2
GC2228M 119,4
GC2230T 128,0
GC2234T 78,8
GC2419T 32,0
GC2423T 64,0
GC2424T 90,5
GC2426T 90,5
GC2427T 59,7
GC2428T 68,6
GC2430T 48,5
GC2432T 36,8
GC2433T 64,0
GC2435T 207,9
GC2436T 111,4
GC2437T 42,2
GC2447T 39,4
GC2448T 68,6
GC2449T 22,6
GC2451T 207,9
GC2461T 26,0
GC2466T 119,4
GC702T 119,4
GC703T 90,5
GC705T 111,4
A A A P A A P P P A A A P A P P A A A P A A P P A A A P A A P P P

Figura 3:


A*2402/CDC2-001
A*2402/ Estimulación de control negativo
A*2402/ Multímero de control negativo
0,020
0,010
95,681
4,298
0,030
0,000
99,970
0,000
A*2402/ multímero CDC2-001
A*2402/ASPM-002
A*2402/ Estimulación de control negativo
A*2402/ multímero ASPM-002
8,552
0,000
91,438
0,010
0,029
0,010
99,932
0,019
A*2402/ Multímero de control negativo